



**You have downloaded a document from
RE-BUS
repository of the University of Silesia in Katowice**

Title: Zastosowanie spektroskopii Ramana w badaniu niebieskich lakierów samochodowych : ocena wartości dowodowej widm w podejściu klasycznym oraz z zastosowaniem metod chemometrycznych i statystycznych

Author: Aleksandra Michalska

Citation style: Michalska, Aleksandra. (2017). Zastosowanie spektroskopii Ramana w badaniu niebieskich lakierów samochodowych : ocena wartości dowodowej widm w podejściu klasycznym oraz z zastosowaniem metod chemometrycznych i statystycznych. Praca doktorska. Katowice : Uniwersytet Śląski

© Korzystanie z tego materiału jest możliwe zgodnie z właściwymi przepisami o dozwolonym użytku lub o innych wyjątkach przewidzianych w przepisach prawa, a korzystanie w szerszym zakresie wymaga uzyskania zgody uprawnionego.



UNIwersYTET ŚLĄSKI
W KATOWICACH



Biblioteka
Uniwersytetu Śląskiego



Ministerstwo Nauki
i Szkolnictwa Wyższego

ROZPRAWA DOKTORSKA

Zastosowanie spektroskopii Ramana w badaniu niebieskich lakierów samochodowych – ocena wartości dowodowej widm w podejściu klasycznym oraz z zastosowaniem metod chemometrycznych i statystycznych

Aleksandra Michalska



Instytut Ekspertyz Sądowych im. Prof. dra Jana Sehna w Krakowie

Promotor pracy:

dr hab. Grzegorz Zadora, prof. IES

Instytut Ekspertyz Sądowych im. Prof. dra Jana Sehna w Krakowie

Instytut Chemii, Wydział Matematyki, Fizyki i Chemii, Uniwersytet Śląski w Katowicach



Instytut Chemii, Wydział Matematyki, Fizyki i Chemii

Uniwersytet Śląski w Katowicach

2017

Spis treści

Streszczenie	5
Summary	6
Wykaz skrótów stosowanych w pracy	7
1. Wstęp	9
2. Lakiery samochodowe – charakterystyka materiału	11
3. Kryminalistyczne badania porównawcze lakierów samochodowych	13
3.1 Metody mikroskopowe	13
3.2 Metody instrumentalne	13
3.2.1 Spektroskopia Ramana	14
4. Interpretacja widm Ramana dla potrzeb wymiaru sprawiedliwości	16
4.1 Modele ilorazu wiarygodności stosowane do rozwiązania problemu porównawczego	18
4.2 Analiza poprawności działania modeli LR	20
4.2.1 Poziom odpowiedzi fałszywych – jakościowa ocena poprawności działania modeli LR	20
4.2.2 Empiryczna Entropia Krzyżowa – ilościowa ocena poprawności działania modeli LR	21
5. Cel pracy	24
6. Przedmiot badań	25
7. Metodyka badań	26
8. Zastosowanie spektroskopii Ramana w badaniu niebieskich lakierów samochodowych	27
8.1 Identyfikacja pigmentów	27
8.2 Wartość dowodowa widm Ramana	30
8.2.1 Wizualne porównanie widm	30
8.2.2 Podejście ilorazu wiarygodności	31
8.2.2.1 Przygotowanie widm	32
8.2.2.2 Redukcja wymiarowości przestrzeni danych	33
8.2.2.2.1 Zmienne typu <i>band area</i>	33
8.2.2.2.2 Zmienne wyselekcjonowane w wyniku zastosowania procedury <i>DWT</i>	34
8.2.2.2.3 Zmienne wyselekcjonowane w wyniku zastosowania procedury <i>DR-LDA</i>	35

8.2.2.3 Modele ilorazu wiarygodności	36
8.2.2.3.1 Wyniki uzyskane dla modeli <i>LR-BA</i>	37
8.2.2.3.2 Wyniki uzyskane dla modeli <i>LR-DWT</i>	40
8.2.2.3.3 Wyniki uzyskane dla modeli hybrydowych <i>LR-DR-LDA</i>	43
8.2.2.4 Klasyczna interpretacja danych <i>vs.</i> modele <i>LR</i>	44
8.3 Ocena wpływu powiększenia obiektywu na interpretację widm Ramana	45
8.3.1 Wpływ powiększenia obiektywu na zmienność widm Ramana	46
8.3.2 Wpływ powiększenia obiektywu na rozwiązanie problemu porównawczego z wykorzystaniem ilorazu wiarygodności	49
8.4 Wstępne naświetlanie próbki (<i>photobleaching</i>) jako metoda pozwalająca uzyskać informatywne widma Ramana	53
8.4.1 Ocena parametrów metody wstępnego naświetlania	54
8.4.1.1 Wpływ parametrów naświetlania na szybkość redukcji fluorescencji	54
8.4.1.2 Analiza powtarzalności procesu wstępnego naświetlania	55
8.4.1.3 Analiza trwałości wygaszenia fluorescencji w wyniku procesu wstępnego naświetlania próbki	56
8.4.2 Ocena wpływu procesu wstępnego naświetlania na pigmenty obecne w lakierze	57
8.4.3 Ocena efektywności procesu wstępnego naświetlania	60
8.4.4 Ocena wpływu parametrów naświetlania na interpretację widm Ramana w obrębie problemu porównawczego z wykorzystaniem podejścia ilorazu wiarygodności	62
9. Podsumowanie	65
10. Literatura	67
Załącznik A – Tabele i rysunki	74
Załącznik B – prace opublikowane wchodzące w cykl rozprawy doktorskiej	75
Załącznik C – Życiorys	176
Załącznik D – Dorobek naukowy	178

PODZIĘKOWANIA

Na wstępie chciałabym podziękować wszystkim życzliwym osobom, bez których wsparcia i pomocy praca ta zapewne nie ujrzałaby światła dziennego, a w szczególności:

Dyrekcji Instytutu Ekspertyz Sądowych Pani dr hab. Marii Kale oraz dr hab. Dariuszowi Zubie, za wsparcie w dążeniu do celu oraz możliwość realizacji doktoratu.

Dyrekcji Instytutu Chemii Wydziału Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach za możliwość przeprowadzenia przewodu doktorskiego.

Promotorowi dr hab. Grzegorzowi Zadorze za niezwykle zaangażowanie, cenne uwagi i wskazówki, skuteczną motywację w chwilach zwątpienia oraz za poświęcony czas i nieocenioną pomoc na każdym etapie realizacji pracy.

Dr Agnieszce Martynie za owocną współpracę, życzliwość i merytoryczną pomoc w realizacji badań.

Rodzicom za trud wychowania i wiarę w możliwość realizacji marzeń.

Marcinowi Kunickiemu za wsparcie, wiarę w marzenia, a przede wszystkim za zapewnienie odpowiednich warunków, aby praca ta mogła powstać.

Szczególne podziękowania kieruje ku swojej Córcie Idze. Dziękuje Ci skarbie za twoją niezwykłą dojrzałość, cierpliwość i wyrozumiałość, która pozwoliła na ukończenie pracy.

Streszczenie

W naukach sądowych weryfikacja hipotezy o wspólnym pochodzeniu próbek (dowodowej i porównawczej) prowadzona w ramach rozwiązywania tzw. problemu porównawczego, jest niezwykle istotnym zagadnieniem. W przypadku próbek lakierowych, opisanych przez widma Ramana, prowadzono ją dotychczas na podstawie wysoce subiektywnego wizualnego porównania widm. Metoda jakkolwiek skuteczna w przypadku widm znacznie się od siebie różniących, jest nieefektywna w ocenie podobieństwa widm bardzo do siebie podobnych. Ponadto, wizualne porównanie nie pozwala w sposób ilościowy na wyrażenie wartości dowodowej, jaką niosą ze sobą widma, ich różnice i podobieństwa. Dlatego też w naukach sądowych zaleca się obiektywizację procesu podejmowania decyzji w kontekście problemu porównawczego poprzez wykorzystanie podejścia ilorazu wiarygodności. Dotychczas, podejście to nie było jednak stosowane w interpretacji widm Ramana, ze względu na problem wymiarowości danych.

W pracy omówiono trzy metody ograniczenia liczby zmiennych przy jednoczesnym zachowaniu istotnych informacji pozwalających opisać próbki. W pierwszym podejściu nowe zmienne stanowiły pola powierzchni pod wybranymi pasmami uznanymi za dystynktywne. W drugim zastosowano dyskretną transformację falkową, a w trzecim widma zastąpiono reprezentacją wzajemnego podobieństwa próbek wyrażoną miarami odległości (Manhattan, Euklidesa, kwadrat Euklidesa, Czebyszewa oraz tej opartej na współczynniku korelacji Pearsona), którą następnie poddano liniowej analizie dyskryminacyjnej. Nowe zmienne posłużyły do konstrukcji jedno i wielowymiarowych modeli LR, których poprawność oceniano analizując poziom odpowiedzi błędnych oraz wyniki Empirycznej Entropii Krzyżowej. Poza zobiektywizowaniem procesu podejmowania decyzji w ramach problemu porównawczego, ustalono, iż bez względu na rodzaj wykorzystanych zmiennych wielowymiarowe modele LR pozwoliły na lepsze, bądź przynajmniej porównywalne, rozróżnienie badanych lakierów, w stosunku do wciąż praktykowanego wizualnego porównania widm. Ponadto, modele te uwzględniły również istotne informacje dotyczące niejednorodności badanych próbek (zmiennosc wewnątrzobiektowa zmiennych opisujących próbki), co nie było możliwe podczas klasycznej interpretacji widm.

W pracy, na uwagę zasługuje również wnikliwa analiza procesu wstępnego naświetlania oraz wykazanie jego przydatności w uzyskiwaniu informatywnych widm Ramana, dla lakierów samochodowych, które w standardowych pomiarach ramanowskich charakteryzują się jedynie fluorescencją.

Ponadto pionierski element pracy stanowi ocena parametrów analitycznych mogących mieć wpływ na wnioskowanie w obrębie problemu porównawczego widm Ramana rozwiązywanego w oparciu o zaproponowane testy ilorazu wiarygodności. Badania wykazały, iż podczas ogniskowania się na powierzchni próbki dowodowej, jak i porównawczej, należy wykorzystać 50× powiększający obiektyw. W przypadku analizy próbek fluorescencyjnych, przed wykonaniem pomiarów ramanowskich można z powodzeniem wykorzystać metodę wstępnego naświetlania w taki sposób, że przy jednym stałym parametrze procesu, np. mocy lasera ustalonym dla próbki dowodowej i porównawczej, drugi tj. czas naświetlania nie musi być kontrolowany.

Summary

Verification of the hypothesis about common origin of recovered and control samples conducted within a comparison problem is one of the most important tasks forensic experts face. Till now such a verification for paint samples described by Raman spectra was usually carried out using highly subjective visual spectra comparison. Such an approach seems to be sufficient only when compared spectra are quite different whereas seems to be pointless in case of very similar spectra. What is more, visual examination does not allow to express evidential value of similarities and discrepancies delivered by such spectra, which is crucial from the forensic perspective. Therefore for making a decision within a comparison problem in the forensic field more objective methods like likelihood ratio (LR) approach are recommended. However, till now LR methodology was not applied in Raman spectra interpretation due to the problem of data dimensionality.

Three methods of data dimensionality reduction which still keep significant information about the analysed samples were discussed. In the first approach areas under the selected pigment bands were used as a new set of variables. In the second approach discrete wavelet transform procedure was used while in the third one Raman spectra were shown in distance representation (Manhattan, Euclidian, square Euclidian, Chebyshev and Pearson correlation coefficient distance) and then linear discriminant analysis was performed. New sets of variables selected upon each procedure were further used for univariate and multivariate LR models construction, which correctness was checked based on the levels of false responses and Empirical Cross Entropy results. Apart from making the evaluation process more objective, it was also stated, that regardless of the applied data dimensionality reduction methodology, multivariate LR models delivered better or at least comparable results to those yielded during visual spectra comparison. In addition these models, in contrary to visual examination, allow to include also the information about inhomogeneity of paint samples influence on the within-object variability.

Analysis of photobleaching process is also noteworthy as it demonstrates its usefulness in obtaining informative Raman spectra for automotive paints, which in ordinary Raman measurements were characterized only by fluorescence.

The evaluation of analytical parameters which could influence the conclusions when solving the comparison problem with the use of likelihood ratio approach is the pioneering element of the thesis. It was stated that for focusing the laser on the surface of both recovered (unknown) and reference samples during Raman measurements, 50× objective magnification should be used. In the case of fluorescent paints the photobleaching pre-treatment may be successfully used prior to normal Raman measurements in such a way that having established one parameter for control and recovered sample e.g. laser power, the second parameter, e.g. time of irradiation does not have to be strictly controlled.

Wykaz skrótów stosowanych w pracy

Skrót	Nazwa angielska	Nazwa polska
BA	<i>band area</i>	pole powierzchni pod pikiem
BIC	<i>Bayesian Information Criterion</i>	Bayesowskie kryterium informacji
CARS	<i>coherent anti-Stokes Raman Spectroscopy</i>	wymuszona antystokesowska spektroskopia Ramana
CCD	<i>charge coupled device</i>	detektor CCD
C.I.	<i>colour index name</i>	międzynarodowy indeks barw
$C_{llr,cal}$	<i>cost of log-likelihood-ratio after calibration</i>	-
$C_{llr,exp}$	<i>cost of experimental log-likelihood-ratio</i>	-
CWT	<i>continuous wavelet transform</i>	ciągła transformacja falkowa
DP	<i>discrimination power</i>	siła dyskryminacyjna
DR	<i>distance representation</i>	reprezentacja wzajemnego podobieństwa próbek
DWT	<i>discrete wavelet transform</i>	dyskretna transformacja falkowa
FTIR	<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>	spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera
ECE	<i>empirical cross entropy</i>	empiryczna entropia krzyżowa
F_n	<i>false negative answers</i>	odpowiedzi fałszywie negatywne
F_p	<i>false positive answers</i>	odpowiedzi fałszywie pozytywne
HCA	<i>hierarchical cluster analysis</i>	hierarchiczna analiza skupień
LDA	<i>linear discriminant analysis</i>	liniowa analiza dyskryminacyjna
LP	<i>laser power</i>	moc lasera
LR	<i>likelihood ratio</i>	iloraz wiarygodności
LS	<i>logarithmic scoring rule</i>	reguła <i>logarithmic scoring</i>
MSP UV-VIS	<i>UV-VIS microspectrophotometry</i>	mikrospektrofotometria w zakresie widzialnym i ultrafioletowym
N.A.	<i>numerical aperture</i>	apertura numeryczna
PAV	<i>pool adjacent violators</i>	algorytm PAV
PB 15	<i>copper phthalocyanine</i>	ftalocyjanina miedzi
PB 27	<i>Prussian blue</i>	błękit pruski
PB 60	<i>indanthrone</i>	błękit indantrenowy RS
PBK 7	<i>carbon black</i>	węgiel amorficzny

Skrót	Nazwa angielska	Nazwa polska
PCA	<i>principal component analysis</i>	analiza czynników głównych
PG 7	<i>polychlorinated copper phthalocyanine</i>	polichlorowana ftalocyjanina miedzi
PW 6	<i>titanium white</i>	biel tytanowa
PV 23	<i>dioxazine violet</i>	-
PY 34	<i>lead chromate</i>	żółcień chromowa
Py-GC/MS	<i>pyrolysis gas chromatography/mass spectrometry</i>	pirolityczna chromatografia gazowa sprzężona z detekcją mas
RRS	<i>resonance Raman spectroscopy</i>	rezonansowa spektroskopia Ramana
RS	<i>Raman spectroscopy</i>	spektroskopia Ramana
RSD	<i>relative standard deviation</i>	względne odchylenie standardowe
SEM-EDX	<i>scanning electron microscopy energy dispersive X-ray detector</i>	skaningowa mikroskopia elektronowa sprzężona z detekcją promieniowania rentgenowskiego
SERDS	<i>shifted excitation Raman difference spectroscopy</i>	przesuniętego wzbudzenia różnicowa spektroskopia Ramana
SERS	<i>surface enhanced Raman spectroscopy</i>	powierzchniowo wzmocniona spektroskopia Ramana
SNV	<i>standard normal variate transform</i>	transformacja SNV
SRS	<i>stimulated Raman scattering</i>	spontaniczne rozpraszanie Ramana
SSRS	<i>subtracted shifted Raman spectroscopy</i>	oddzielająca przesunięcie spektroskopia Ramana
XRF	<i>X-ray fluorescence spectroscopy</i>	spektroskopia fluorescencji rentgenowskiej

CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1. Wstęp

Ślady lakierowych powłok samochodowych należą do najczęściej spotykanych mikrośladów ujawnianych na miejscu wypadków drogowych. Mogą mieć postać zarówno odłamków lakierowych znajdujących na jezdni bądź odzieży ofiary, jak również otarć pozostawionych na odzieży poszkodowanego, samochodzie, czy innym przedmiocie biorącym udział w kolizji.

W przypadku, gdy śledczy nie dysponują materiałem porównawczym rolą biegłego sądowego jest przeprowadzenie badań identyfikacyjnych, a więc uzyskanie jak najpełniejszej informacji na temat badanego lakieru. W wyniku tych badań biegłemu niejednokrotnie udaje się ustalić markę samochodu, jego model, a czasem również rok produkcji, co w konsekwencji może doprowadzić do zatrzymania sprawcy przestępstwa (Zięba-Palus 2015).

W przypadku, gdy materiał porównawczy jest dostępny, biegły przeprowadza badania porównawcze. Celem tych badań jest udzielenie odpowiedzi na pytanie - *czy lakier dowodowy ujawniony na miejscu zdarzenia, bądź odzieży ofiary i lakier porównawczy zabezpieczony z samochodu podejrzanego o udział w wypadku mogą pochodzić z tego samego obiektu?* W trakcie badań porównawczych wykorzystuje się szereg metod analitycznych, takich jak metody mikroskopowe (Caddy 2001, Nieznańska i in. 1999, Zięba-Palus 2015), spektroskopowe (Buzzini i in. 2006, Massonnet i Stoecklein 1999a-c, Zięba-Palus i Trzcńska 2012), czy chromatograficzne (Zięba-Palus i in. 2008). Wśród metod spektroskopowych prym wiedzie spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (*FTIR*), która dostarcza informacji o typie spoiwa, jak i rodzaju wypełniaczy, czy pigmentów nieorganicznych (Buzzini i Massonnet 2004, Caddy 2001). W badaniach porównawczych lakierów samochodowych coraz częściej wykorzystuje się również spektroskopię Ramana (*RS*). Metoda ta pozwala analizować bardzo małe fragmenty powłok ($< 10 \mu\text{m}$), bez ich specjalnego przygotowania (*in situ*) i dostarcza informacji zarówno o organicznych, jak i nieorganicznych pigmentach obecnych w analizowanych próbkach (de Gelder i in. 2005, Zięba-Palus i in. 2011).

Ocenę podobieństwa badanych lakierów na podstawie wyników spektroskopii Ramana prowadzi się zwykle poprzez wizualne porównanie widm. Metoda ta, jakkolwiek skuteczna w przypadku widm znacznie się od siebie różniących, jest nieefektywna w ocenie podobieństwa widm bardzo do siebie podobnych. Ponadto wizualne porównanie nie pozwala w sposób ilościowy na wyrażenie wartości dowodowej, jaką niosą ze sobą widma, ich różnice i podobieństwa. Ilościowa ocena wartości dowodowej widm zarejestrowanych dla porównywanych lakierów możliwa jest przy zastosowaniu testów ilorazu wiarygodności (*likelihood ratio* (*LR*), $LR = Pr(E/H_1)/Pr(E/H_2)$). Modele *LR* pozwalają na wyrażenie roli biegłego sądowego poprzez interpretację dowodu (np. widma Ramana, *E*) w kontekście przeciwstawnych hipotez (H_1 : porównywane próbki lakierów pochodzą z tego samego samochodu, H_2 : porównywane próbki lakierów pochodzą z różnych samochodów), uwzględniając jednocześnie możliwe źródła błędów związane ze zmiennością wewnątrz-

i międzyobiektową badanych próbek oraz częstość występowania danej cechy w populacji generalnej (Zadora i in. 2014). Niemniej jednak modele *LR* działają prawidłowo w sytuacji, gdy liczba próbek znajdujących się w bazie danych (m) jest zdecydowanie większa niż liczba zmiennych (p), które opisują te próbki. W przypadku widm Ramana sytuacja jest niestety odwrotna ($m < p$), gdyż każda próbka opisana jest przez co najmniej kilkaset zmiennych. Stąd, aby móc zastosować podejście ilorazu wiarygodności w interpretacji widm Ramana koniecznym jest zmniejszenie wymiarowości tych widm. Poszukiwane są zatem zmienne niosące jak najbardziej użyteczną informację na temat porównywanych próbek, które pozwalają jednocześnie na spełnienie warunku $m \gg p$.

Przed rutynowym stosowaniem danej metody analitycznej należy przeprowadzić proces walidacji, obejmujący między innymi ocenę parametrów pomiaru mogących mieć wpływ na wynik. Taka analiza jest szczególnie istotna w przypadku interpretacji danych z wykorzystaniem metod statystycznych lub chemometrycznych. Może się bowiem okazać, iż o ile w przypadku klasycznego podejścia (np. wizualne porównywanie widm) dany parametr nie wpływa na interpretację, o tyle w przypadku stosowania metod obliczeniowych taki wpływ na poziom odpowiedzi błędnych, związanych ze zmiennością wewnątrzobiektową i międzyobiektową próbek jest identyfikowany. W przypadku zaobserwowania wpływu takiego parametru prowadzi się proces optymalizacji polegający na wyborze takich ustawień aparaturowych, które ograniczą procent odpowiedzi fałszywie pozytywnych i negatywnych dostarczanych przez metodę obliczeniową.

W porównawczej analizie lakierów samochodowych prowadzonej zarówno na podstawie wizualnego porównania widm Ramana, jak też porównania widm przy zastosowaniu metod statystycznych i chemometrycznych problem stanowić może również fluorescencja, która jest procesem konkurencyjnym do rozpraszania Ramana i występuje w tym samym zakresie spektralnym, co stokesowski sygnał ramanowski. Biorąc pod uwagę fakt, iż intensywność fluorescencji jest zwykle większa niż intensywność sygnału ramanowskiego, pojawienie się tego efektu może całkowicie, bądź częściowo maskować pasma pochodzące od analitu. Poszukuje się zatem stosownych metod redukcji fluorescencji, które pozwolą „wydobyć” sygnał ramanowski nie zmieniając go (Wei i in. 2015). Jedną z technik będącą w sferze zainteresowań naukowców, jest metoda wstępnego naświetlania (*photobleaching*) (Wei i in. 2015, **Zięba-Palus i Michalska 2014b**¹⁾) polegająca na długotrwałym naświetlaniu próbki laserem o dużej mocy. Aby móc ją jednak rutynowo wykorzystywać w przypadku próbek dowodowych, należy ocenić, czy jej stosowanie nie wpłynie niszcząco na identyfikowany analit. W przypadku implementowania metod obliczeniowych do widm uzyskanych po zastosowaniu takiego procesu w obrębie problemu porównawczego ocenia się dodatkowo, czy zastosowanie tej metody przed wykonaniem standardowych pomiarów ramanowskich, a dokładniej wykorzystanie różnych parametrów naświetlania (czas i moc lasera) dla próbki dowodowej i porównawczej nie będą przyczyną błędnych wniosków dostarczanych przez metodę obliczeniową.

1) Czcionką pogrubioną zaznaczono prace wchodzące w skład cyklu rozprawy (szczegółowy wykaz prac znajduje się w Załączniku B)

2. Lakiery samochodowe – charakterystyka materiału

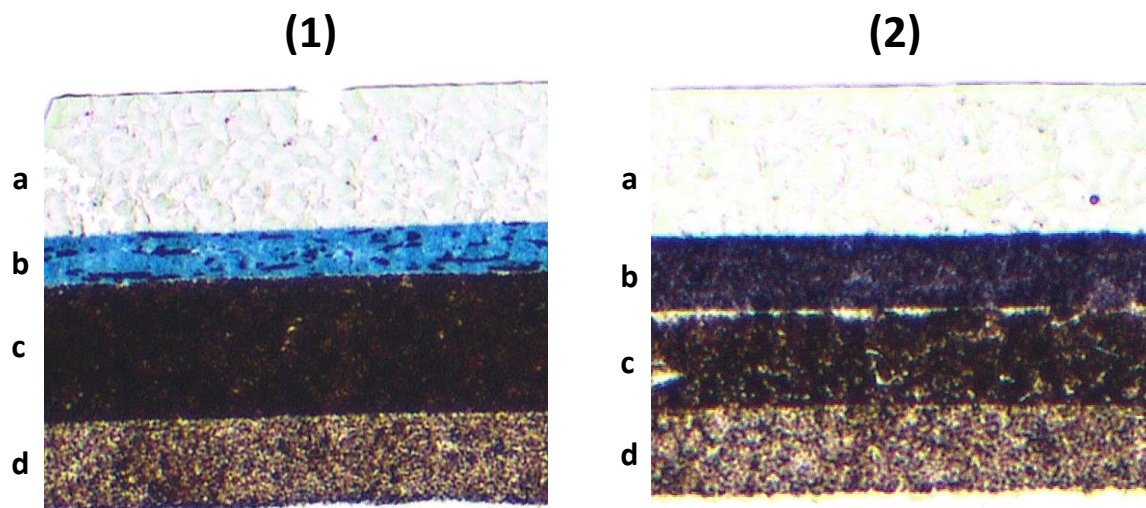
Oryginalne samochodowe powłoki lakierowe wykonane są zwykle z 3-4 warstw malarskich, z których każda spełnia określone funkcje tj. antykorozyjną, podkładową, dekoracyjną i ochronną (Caddy 2001, de Gelder i in. 2005, Skenderovska i in. 2008, Zięba-Palus 2002). W przypadku lakierów poddawanych procesowi renowacji liczba warstw może być zdecydowanie większa, niemniej jednak najbardziej zewnętrzne warstwy lakieru powinny spełniać rolę dekoracyjną i/lub ochronną.

Każda z warstw powłoki stanowi wieloskładnikową mieszaninę zawierającą m.in. żywice tworzące tzw. spoiwo lakiernicze (do 80% masy powłoki), wypełniacze (tzw. obciążniki) czy pigmenty (de Gelder i in. 2005, Zięba-Palus 2015). Poszczególne warstwy powłoki lakierowej różnią się między sobą grubością, uziarnieniem, jak również składem chemicznym, który zdeterminowany jest przez funkcję, jaką dana warstwa powłoki spełnia (Caddy 2001, Zięba-Palus 2002).

Najbardziej wewnętrzną warstwę powłoki stanowi warstwa antykorozyjna. Przylega ona bezpośrednio do karoserii samochodu i zapewnia przyczepność całej powłoki lakierowej, jak również chroni karoserię samochodu przed korozją. W jej skład wchodzi m.in. żywice epoksydowe tworzące spoiwo, wypełniacze, czy pigmenty antykorozyjne np. fosforan (V) cynku, czy mieszanina fosforanu (V) cynku i fosforanu (V) żelaza (III) (Caddy 2001, de Gelder i in. 2005, Zięba-Palus 2002). Następną warstwę tworzy lakier podkładowy, który zapewnia właściwe krycie, nadaje odpowiednie właściwości mechaniczne powłoce oraz chroni powłokę m.in. przed działaniem promieni słonecznych. W skład tej warstwy wchodzi zwykle podstawowe pigmenty i obciążniki zawieszone w niewielkiej ilości spoiwa zwykle żywicy epoksydowej (de Gelder i in. 2005).

Z punktu widzenia spektroskopii Ramana najbardziej interesująca jest warstwa dekoracyjna zwana również bazową, która odpowiedzialna jest za nadanie walorów estetycznych powłoce. W jej skład wchodzi znaczne ilości pigmentów (drobnoziarnistych związków barwnych zawieszonych i rozproszonych w żywicy lecz z nią nie oddziaływujących), które nadają powłoce stosowny kolor. W przypadku lakierów typu metalik w warstwie tej obecne są również płatki aluminium, bądź płatki miki (Caddy 2001) zapewniające charakterystyczny metaliczny połysk. Najbardziej zewnętrzną warstwę stanowi warstwa ochronna, tzw. *clearcoat*. Warstwa ta pozbawiona jest pigmentacji, a tworzą ją głównie żywice np. alkidowa, akrylowa, melaminowa, czy uretanowa modyfikowana np. styrenem (Zięba-Palus 2002).

Przykłady przekrojów niebieskich powłok lakierowych obrazujące budowę lakieru typu metalik i niemetalik przedstawiono na rys. 1.



Rys. 1. Przekrój poprzeczny lakieru typu: (1) metalik, (2) niemetalik. Literowo oznaczono poszczególne warstwy lakieru: a) ochronną (*clearcoat*), b) dekoracyjną (*basecoat*), c) podkładową (*primer*), d) antykorozyjną (*first primer*).

3. Kryminalistyczne badania porównawcze lakierów samochodowych

Ślady lakierowe ujawniane na miejscu zdarzenia stanowią niepowtarzalny materiał, występujący zwykle w znikomej ilości, często o niepełnej strukturze (np. otarcia lakierowe), bądź dodatkowo zanieczyszczony podłożem lub innym materiałem, na który zostały naniesione (Skenderovska i in. 2008, Zięba-Palus 2002). Pomimo, iż materiał porównawczy charakteryzuje się zwykle przeciwstawnymi cechami, to wybór metody wykorzystywanej w badaniach porównawczych prowadzonych dla potrzeb wymiaru sprawiedliwości i organów ścigania podyktowany jest właściwościami materiału dowodowego. Stosowane metody, powinny zatem spełniać następujące kryteria (np. Buzzini i Suzuki 2015):

- ✓ być nieniszczące, a więc pozwalać na powtórny analizę próbki w innym laboratorium, bądź przy pomocy innych metod analitycznych,
- ✓ nie wymagać wstępnego przygotowania próbki,
- ✓ być czułe, stąd ilość próbki wystarczającej do przeprowadzenia analizy powinna być niewielka,
- ✓ wyniki analizy powinny być uzyskiwane stosunkowo szybko,
- ✓ pozwalać uzyskać dane o charakterze jakościowym, ilościowym, bądź półilościowym,
- ✓ charakteryzować się dużą siłą dyskryminacji.

Niestety nie istnieje metoda idealna, która spełniałaby wszystkie powyższe kryteria. Stąd w badaniach porównawczych lakierów stosuje się szereg metod, które pozwalają ocenić zarówno cechy morfologiczne, jak i skład chemiczny porównywanych próbek.

3.1 Metody mikroskopowe

W analizie porównawczej lakierów samochodowych w pierwszej kolejności wykorzystywane są różne techniki mikroskopowe, tj. mikroskopia stereoskopowa, fluorescencyjna, czy polaryzacyjna, które pozwalają na ocenę podobieństwa cech morfologicznych próbek (Buzzini i Suzuki 2015, Caddy 2001, Zięba-Palus 2002). Obserwacja przekrojów powłok lakierowych pozwala porównać liczbę, grubość, barwę, a także ułożenie poszczególnych warstw w lakierach. Możliwe jest również zaobserwowanie ewentualnych różnic w kształcie, czy w rozmieszczeniu drobin (np. płatków aluminium lub pigmentów) w warstwach powłoki (Nieznańska i in. 1999, Zięba-Palus 2015).

W przypadku, gdy zastosowanie technik mikroskopowych nie pozwala na jednoznaczne rozróżnienie porównywanych lakierów biegły „sięga” po metody analizy instrumentalnej.

3.2. Metody instrumentalne

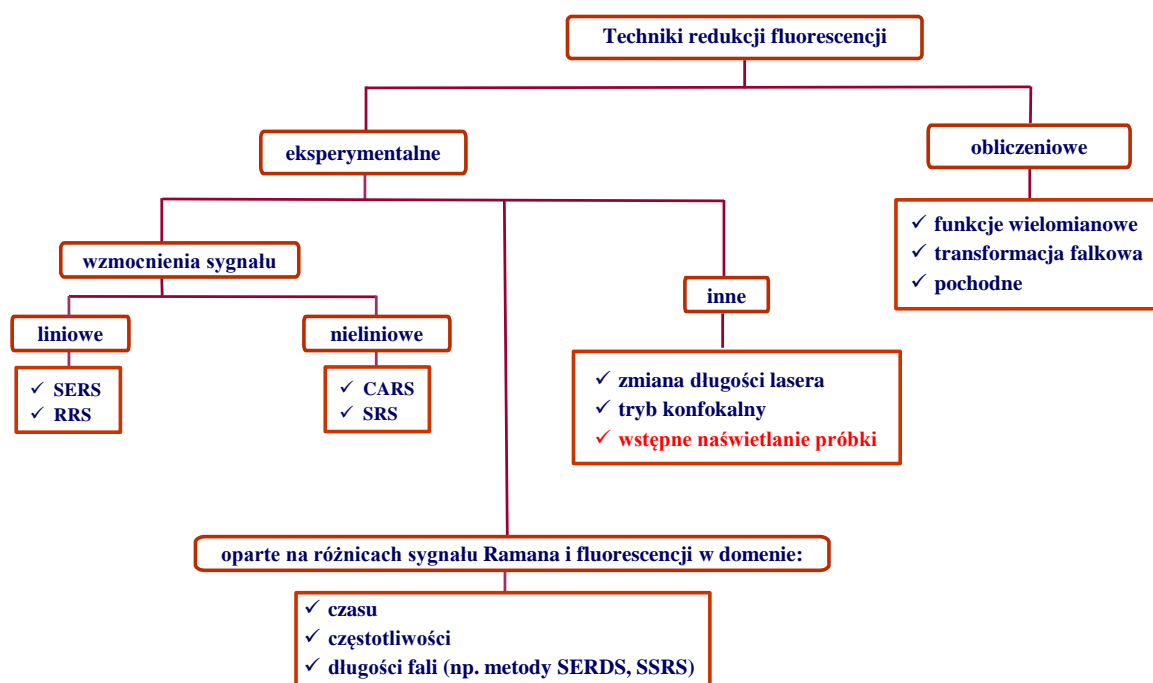
Spośród dostępnych metod analizy instrumentalnej w badaniach porównawczych lakierów w pierwszej kolejności wykorzystywana jest zwykle spektroskopia w podczerwieni

z transformacją Fouriera (*FTIR*). Metoda ta pozwala przede wszystkim na zidentyfikowanie rodzaju spoiwa, a więc detekcję głównego składnika każdej z warstw powłoki lakierowej (Caddy 2001, Zięba-Palus 2002). Nierzadko dostarcza również informacji na temat rodzaju wypełniaczy i pigmentów nieorganicznych. W badaniach porównawczych lakierów samochodowych coraz częściej wykorzystywana jest również spektroskopia Ramana (*RS*), która pozwala identyfikować zarówno organiczne, jak i nieorganiczne pigmenty obecne w analizowanych próbkach (de Gelder i in. 2005, Skenderovska i in. 2008, Zięba-Palus i in. 2011). Na obiektywne porównanie barwy pozwala natomiast metoda mikrospektrofotometrii w zakresie widzialnym i ultrafioletowym (*MSP UV-VIS*; Massonnet i Stoecklein 1999a, Zięba-Palus i Trzcńska 2012). W badaniach lakierów stosowana jest również pirolityczna chromatografia gazowa sprzężona z detekcją mas (*Py-GC/MS*). Metoda pozwala na dalsze różnicowanie lakierów charakteryzujących się tym samym typem spoiwa (Zięba-Palus i in. 2008), lecz ze względu na niszczący charakter nie jest powszechnie stosowana. W analizie porównawczej lakierów zastosowanie znajdują również skaningowa mikroskopia elektronowa sprzężona z detekcją promieniowania rentgenowskiego (*SEM-EDX*) i metoda fluorescencji rentgenowskiej (*XRF*), które pozwalają na porównanie lakierów na podstawie ich składu pierwiastkowego (Caddy 2001, Zięba-Palus 2015).

3.2.1 Spektroskopia Ramana

Metoda spektroskopii Ramana spełnia wiele kryteriów metody idealnej. Jest nieniszcząca, pozwala analizować bardzo małe fragmenty powłok ($<10\ \mu\text{m}$), bez ich specjalnego przygotowania (*in situ*), a wynik analizy otrzymuje się stosunkowo szybko (Buzzini i Suzuki 2015). Co więcej, w odróżnieniu od spektroskopii w podczerwieni, metoda jest bardzo czuła w wykrywaniu pigmentów zarówno organicznych, jak i nieorganicznych, których zawartość procentowa w warstwie bazowej lakieru jest zwykle niewielka (od 1% do kilku % wagowych; Zięba-Palus 2015). Biorąc pod uwagę możliwości dyskryminacyjne metody wydawać by się mogło, iż lakiery o podobnej barwie będą się charakteryzować podobnym widmem ramanowskim, co może wynikać z faktu, iż różni producenci wykorzystują ten sam pigment, bądź mieszaniny pigmentów, aby uzyskać konkretną barwę lakieru. Niemniej jednak różnice w przekroju czynnym na rozpraszanie dla różnych pigmentów, możliwość uzyskania wzmocnienia rezonansowego danego pigmentu przy zastosowaniu odpowiedniego źródła wzbudzania, czy wreszcie możliwość detekcji różnic w stosunku ilościowym pigmentów sprawia, że spektroskopia Ramana charakteryzuje się dość znaczną siłą dyskryminacji (Buzzini i Suzuki 2015) rozumianą jako zdolność metody do rozróżniania próbek lakierów samochodowych pobranych z różnych samochodów. Siła dyskryminacji metody może dodatkowo wzrosnąć, gdy w badaniach wykorzystuje się kilka źródeł wzbudzania próbek (Buzzini i Massonnet 2004, Buzzini i Suzuki 2015, Zięba-Palus i Michalska 2014a, Zięba-Palus i Wąs-Gubała 2011).

Niemniej jednak zdarza się, iż badania lakierów metodą spektroskopii Ramana mogą być utrudnione lub wręcz niemożliwe w wyniku pojawienia się zjawiska fluorescencji (Buzzini i Massonnet 2004, **Zięba Palus i Michalska 2014a**). Fluorescencja jest procesem konkurencyjnym do rozpraszania ramanowskiego i występuje w tym samym zakresie spektralnym, co stokesowski sygnał ramanowski, a jej intensywność jest zwykle kilka rzędów wielkości większa niż intensywność sygnału ramanowskiego. Stąd pojawienie się fluorescencji może całkowicie maskować pasma, np. pigmentów, uniemożliwiając tym samym ich identyfikację lub różnicowanie próbek lakierowych. Na szczęście oba procesy, tj. zjawisko fluorescencji i efekt Ramana, różnią się pewnymi własnościami fizykochemicznymi (Wei i in. 2015), takimi jak: czas trwania sygnału, częstotliwość sygnału, szerokość sygnału oraz zależność położenia sygnału od długości lasera użytego do jego wzbudzenia, co stanowi podstawę rozwijania stosownych metod redukcji fluorescencji (rys. 2).



Rys. 2. Metody wykorzystywane w redukcji fluorescencji obserwowanej w widmach Ramana. Opracowanie własne na podstawie (Palenik i in. 2014, Wei i in. 2015).

Jedną z metod redukcji fluorescencji należącą do tzw. technik eksperymentalnych jest metoda wstępnego naświetlania (*photobleaching*). Metoda polega na pozostawieniu próbki wykazującej fluorescencję pod wiązką laserową o dużej mocy przez dłuższy okres czasu, po którym wykonywany jest standardowy pomiar ramanowski. Zgodnie z teorią podczas długotrwałego naświetlania próbki fluorescencja pochodząca od podłoża powinna ulec wygaszeniu, podczas gdy sygnał ramanowski powinien pozostać niezmienny.

4. Interpretacja widm Ramana dla potrzeb wymiaru sprawiedliwości

Dane fizykochemiczne dostarczane przez każdą metodę analityczną muszą zostać w odpowiedni sposób zinterpretowane. W przypadku rozwiązywania problemu porównawczego rolą biegłego sądowego jest porównanie wyników uzyskanych dla próbki dowodowej, np. zabezpieczonej z miejsca wypadku drogowego, z wynikami uzyskanymi dla próbki porównawczej, np. pochodzącej z samochodu podejrzanego o udział w zdarzeniu, w celu udzielenia odpowiedzi na pytanie, czy obie próbki mogły pochodzić z tego samego samochodu (Aitken i Taroni 2004, Zadora i in. 2014).

Ocenę podobieństwa badanych lakierów na podstawie wyników spektroskopii Ramana prowadzi się zwykle poprzez wizualne porównanie widm. Metoda ta, jakkolwiek skuteczna w przypadku widm znacznie się od siebie różniących, wydaje się być nieefektywna w przypadku widm bardzo do siebie podobnych. Wizualne porównanie widm nie pozwala bowiem obiektywnie ocenić, czy niewielkie różnice w widmach zarejestrowanych dla porównywanych próbek nie wynikają np. z ich niejednorodności, czy zanieczyszczenia materiału dowodowego (Zadora i in. 2015). Ponadto, w przypadku pełnej zgodności porównywanych widm brak jest rzetelnej oceny, czy zaobserwowane podobieństwo nie jest przypadkowe. Dlatego też w analizie danych fizykochemicznych powinny być stosowane odpowiednie narzędzia, które pozwolą obiektywnie ocenić wartość dowodową obserwowanych podobieństw i różnic. Takim narzędziem, które znajduje zastosowanie w naukach sądowych jest podejście ilorazu wiarygodności (*likelihood ratio*; *LR*).

Podejście to pozwala zinterpretować uzyskane dane (np. widma Ramana) w kontekście dwóch przeciwstawnych hipotez tj.: hipotezy H_1 , stawianej często przez prokuratora, w której zakładamy, iż porównywane próbki pochodzą z tego samego obiektu oraz hipotezy H_2 , utożsamianej zwykle ze zdaniem obrony, która twierdzi, iż pochodzenie porównywanych próbek jest różne. W praktyce metoda sprowadza się do ustalenia prawdopodobieństw warunkowych – $Pr(E/H_1)$ i $Pr(E/H_2)$ – i wyznaczenia wartości ilorazu wiarygodności:

$$LR = \frac{Pr(E|H_1)}{Pr(E|H_2)}.$$

Iloraz wiarygodności pozwala ocenić nie tylko to, która z hipotez jest bardziej prawdopodobna, ale również oszacowuje siłę wsparcia dla konkretnej hipotezy. Gdy wartość LR jest większa od 1, to dowód E wspiera hipotezę H_1 , a gdy jego wartość jest mniejsza od 1, to wspiera hipotezę H_2 , przy czym im większa od 1 (mniejsza od 1) jest wartość LR , tym mocniejsze wsparcie dla hipotezy H_1 (H_2).

Ponadto, poza rzetelną oceną podobieństwa porównywanych próbek, metoda ta pozwala uwzględnić inne istotne z punktu widzenia nauk sądowych czynniki, takie jak:

- ✓ częstość występowania danej cechy w populacji generalnej (np. częstość występowania pasma pochodzącego od danego pigmentu w grupie niebieskich lakierów samochodowych),
- ✓ możliwe źródła błędów w tym zmienność wewnątrzobiekтовую wynikającą np. z niejednorodności próbek, czy zmienność międzyobiekтовую oceniającą np. jak bardzo widma Ramana rejestrowane dla grupy niebieskich lakierów samochodowych różnią się między sobą,
- ✓ korelacje pomiędzy analizowanymi cechami fizykochemicznymi w przypadku analizy danych wielowymiarowych.

Niemniej jednak modele *LR* działają poprawnie jedynie w przypadku danych o małej wymiarowości, tj. gdy liczba obiektów (próbek) znajdujących się w bazie danych (m) jest zdecydowanie większa niż liczba zmiennych (p), które je opisują (sytuacja, gdy $m \gg p$). W przypadku danych wielowymiarowych, jakie stanowią np. widma Ramana (sytuacja gdy, $m < p$), rzetelne ustalenie parametrów populacyjnych takich jak średnie, wariancje, czy kowariancje jest utrudnione lub wręcz niemożliwe. Stąd przed zastosowaniem podejścia ilorazu wiarygodności koniecznym jest zmniejszenie wymiarowości danych przy jednoczesnym zachowaniu przez nowe zmienne istotnych informacji pozwalających opisać próbki. W przypadku widm Ramana do redukcji wymiarowości można zastosować m.in.:

- ✓ *podejście naiwne* (**Michalska i in. 2015**, Zadora i in. 2014), w którym zmniejszenie wymiarowości p -wymiarowego problemu następuje poprzez podzielenie go na p niezależnych problemów jednowymiarowych tj. $LR = LR_1 \cdot LR_2 \cdot \dots \cdot LR_p$, przy czym w podejściu tym zakłada się niezależność zmiennych,
- ✓ *dyskretną transformację falkową (DWT; Martyna i in. 2015*, Walczak i Massart 1997), która pozwala przeprowadzić dekompozycję sygnału (np. widma Ramana) na podstawie różnic jego częstotliwości składowych i przedstawić widmo w postaci szeregu współczynników, które zachowują informacje o jego kształcie i istotnych cechach o charakterze chemicznym, jednocześnie redukując liczbę zmiennych,
- ✓ *analizę czynników głównych (PCA; Mazerski 2016)* należącą do tzw. technik uczenia bez nadzoru, polegającą na takiej rotacji oryginalnego układu współrzędnych, aby utworzyć nowy układ, w którym kilka pierwszych ortogonalnych zmiennych (tzw. czynników głównych) wytłumaczy maksimum wariancji danych oryginalnych,
- ✓ *liniową analizę dyskryminacyjną (LDA; Stanimirova i in. 2008, Martyna i in. 2016)* należącą do tak zwanych technik uczenia z nadzorem, polegającą na konstruowaniu liniowych funkcji dyskryminacyjnych opartych na danych surowych wyznaczających takie kierunki w przestrzeni, które maksymalizują wariancję pomiędzy klasami przy jednoczesnej minimalizacji wariancji wewnątrz klas. Zakładając, iż widma uzyskane dla konkretnej próbki lakierowej stanowią oddzielną klasę możliwa jest redukcja

wymiarowości do kilku pierwszych funkcji *dyskryminacyjnych*, które wytłumaczają największą część wariancji związanej z grupowaniem próbek.

- ✓ *reprezentację wzajemnego podobieństwa próbek (DR; Martyna i in. 2016)* w podejściu tym zmniejszenie wymiarowości następuje poprzez zastąpienie widm (danych surowych) ich odległościami od odpowiednio zdefiniowanego zestawu widm referencyjnych.

4.1 Modele ilorazu wiarygodności stosowane do rozwiązania problemu porównawczego

Modele LR stosowane do rozwiązania problemu porównawczego bazują na następujących założeniach (Aitken i in. 2007, Zadora i in. 2014). Istnieje odpowiednia baza danych wykorzystywana do oceny zmienności wewnątrzobiektywnej, międzyobiektywnej oraz częstotliwości występowania danej cechy w populacji generalnej. Baza ta, składa się z m obiektów (próbek) opisanych przez p zmiennych uzyskanych w trakcie n pomiarów. Każdy z pomiarów można więc zapisać jako $\mathbf{x}_{ij} = (\mathbf{x}_{ij1}, \dots, \mathbf{x}_{ijp})^T$; $i = 1, \dots, m$; $j = 1, \dots, n$.

Dla każdej z porównywanych próbek tj. dowodowej i porównawczej wykonuje się serię pomiarów (n_1 i n_2 , odpowiednio), a następnie wyznacza dwa wektory średnich opisujące te próbki $\bar{\mathbf{y}}_1$ i $\bar{\mathbf{y}}_2$, tj. $\bar{\mathbf{y}}_l = \frac{1}{n_l} \sum_{j=1}^{n_l} \mathbf{y}_{lj}$ dla $l=1,2$, a także średnią ważoną tych wektorów, tj. $\mathbf{y}^* = \frac{n_1 \bar{\mathbf{y}}_1 + n_2 \bar{\mathbf{y}}_2}{n_1 + n_2}$.

Prokurator formułuje hipotezę H_1 , iż próbka dowodowa i porównawcza (opisane przez wektory średnich $\bar{\mathbf{y}}_1$ i $\bar{\mathbf{y}}_2$) pochodzą z tego samego obiektu, podczas gdy obrona stawia hipotezę H_2 , iż pochodzenie próbek jest różne. Wyrażenie na iloraz wiarygodności w przypadku danych typu ciągłego, przyjmuje postać:

$$LR = \frac{f(\bar{\mathbf{y}}_1, \bar{\mathbf{y}}_2 | H_1, \mathbf{U}, \mathbf{C})}{f(\bar{\mathbf{y}}_1, \bar{\mathbf{y}}_2 | H_2, \mathbf{U}, \mathbf{C})},$$

gdzie $f(\cdot)$ oznacza funkcję gęstości prawdopodobieństwa w przypadku rozpatrywania hipotez H_1 i H_2 .

Następnie ocenia się dwa istotne źródła zmienności: zmienność wewnątrzobiektową (\mathbf{U}) oraz zmienność międzyobiektową (\mathbf{C}). W przypadku, gdy liczba pomiarów (n) dla każdej z próbek znajdujących się w bazie danych (m) jest jednakowa, to wówczas zmienność wewnątrzobiektyowa, wyrażana jest w formie macierzy wariancji-kowariancji, którą można oszacować jako $\mathbf{U} = \mathbf{S}_w / m(n-1)$, gdzie $\mathbf{S}_w = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n (\mathbf{x}_{ij} - \bar{\mathbf{x}}_i)(\mathbf{x}_{ij} - \bar{\mathbf{x}}_i)^T$, podczas

gdy zmienność międzyobiektowa wyrażana jest w formie macierzy wariancji-kowariancji np.

jako $\mathbf{C} = \frac{\mathbf{S}}{m-1} - \frac{\mathbf{S}_w}{n(mn-m)}$, gdzie $\mathbf{S} = \sum_{i=1}^m (\mathbf{x}_i - \bar{\mathbf{x}})(\mathbf{x}_i - \bar{\mathbf{x}})^T$ oraz $\bar{\mathbf{x}} = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n \mathbf{x}_{ij} / mn$.

W sytuacji, gdy liczba pomiarów (n) dla próbek tworzących bazę danych (m) jest różna (sytuacja, gdy np. dla próbki m_1 $n=3$, a dla próbki m_2 $n=5$), można wykorzystać wzory opisane w **Martyna i in. (2015)**.

Oceniając zmienność wewnątrzobiektową próbek (np. lakierów samochodowych) wykonuje się zwykle niewielką liczbę pomiarów, stąd zmienność tą można przybliżyć rozkładem normalnym. Zmienność międzyobiektowa próbek zwykle nie może być estymowana rozkładem normalnym (jak to ma miejsce w przypadku próbek lakierów samochodowych, co opisano w **Michalska i in. (2015)**). Stąd, aby opisać funkcję gęstości prawdopodobieństwa można wykorzystać np. procedurę estymacji jądrowej (Silverman 1986, Zadora i in. 2014). Korzystając z funkcji jądra gaussowskiego, o średniej \mathbf{x}_i i kowariancji $h^2\mathbf{C}$, można zapisać, że

$$K(\boldsymbol{\theta}|\mathbf{x}_i, \mathbf{C}, h) = (2\pi)^{-p/2} |h^2\mathbf{C}|^{-1/2} \exp\left\{-\frac{1}{2}h^{-2}(\boldsymbol{\theta} - \mathbf{x}_i)^T \mathbf{C}^{-1}(\boldsymbol{\theta} - \mathbf{x}_i)\right\}.$$

Wówczas funkcja gęstości prawdopodobieństwa przyjmuje postać

$f(\boldsymbol{\theta}|\mathbf{x}_1, \dots, \mathbf{x}_m, \mathbf{C}, h) = \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m K(\boldsymbol{\theta}|\mathbf{x}_i, \mathbf{C}, h)$, gdzie h oznacza tzw. parametr wygładzający, który można

wyznaczyć np. ze wzoru $h = h_{opt} = \left(\frac{4}{m(2p+1)}\right)^{\frac{1}{p+4}}$ (Silverman 1986).

Tym samym licznik ilorazu wiarygodności można zapisać jako (Aitken i in. 2007, Zadora i in. 2014):

$$\begin{aligned} & (2\pi)^{-p/2} \left| \frac{\mathbf{U}}{n_1} + \frac{\mathbf{U}}{n_2} \right|^{-1/2} \exp\left\{-\frac{1}{2}(\mathbf{y}_1 - \mathbf{y}_2)^T \left(\frac{\mathbf{U}}{n_1} + \frac{\mathbf{U}}{n_2}\right)^{-1} (\mathbf{y}_1 - \mathbf{y}_2)\right\} \\ & \times \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m \left\{ (2\pi)^{-p/2} \left| \frac{\mathbf{U}}{n_1 + n_2} + h^2\mathbf{C} \right|^{-1/2} \exp\left[-\frac{1}{2}(\mathbf{y}^* - \mathbf{x}_i)^T \left(\frac{\mathbf{U}}{n_1 + n_2} + h^2\mathbf{C}\right)^{-1} (\mathbf{y}^* - \mathbf{x}_i)\right] \right\}, \end{aligned}$$

a mianownik:

$$\begin{aligned} & (2\pi)^{-p/2} \left| \frac{\mathbf{U}}{n_1} + h^2\mathbf{C} \right|^{-1/2} \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m \exp\left\{-\frac{1}{2}(\mathbf{y}_1 - \mathbf{x}_i)^T \left(\frac{\mathbf{U}}{n_1} + h^2\mathbf{C}\right)^{-1} (\mathbf{y}_1 - \mathbf{x}_i)\right\} \\ & \times (2\pi)^{-p/2} \left| \frac{\mathbf{U}}{n_2} + h^2\mathbf{C} \right|^{-1/2} \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m \exp\left\{-\frac{1}{2}(\mathbf{y}_2 - \mathbf{x}_i)^T \left(\frac{\mathbf{U}}{n_2} + h^2\mathbf{C}\right)^{-1} (\mathbf{y}_2 - \mathbf{x}_i)\right\}. \end{aligned}$$

4.2 Analiza poprawności działania modeli LR

Modele LR stosowane w ocenie danych fizykochemicznych stanowią jedynie narzędzie pomocnicze i tak, jak każda metoda analityczna, powinny zostać zwalidowane. Walidacja modeli LR może obejmować zarówno ich jakościową, jak i ilościową ocenę (Zadora i in. 2014).

4.2.1 Poziom odpowiedzi fałszywych – jakościowa ocena poprawności działania modeli LR

W przypadku rozwiązywania problemu porównawczego ocena jakościowa polega na oszacowaniu możliwości dyskryminacyjnych danego modelu, a więc ustaleniu poziomu odpowiedzi fałszywie pozytywnych i fałszywie negatywnych dostarczanych przez ten model (Zadora i in. 2014).

Procent odpowiedzi fałszywie pozytywnych ocenia się, porównując wyniki uzyskane dla dwóch różnych próbek (np. dwóch powłok lakierowych zabezpieczonych z różnych samochodów). Ponieważ porównuje się wyniki uzyskane dla różnych obiektów, poprawną odpowiedź stanowi każda wartość LR poniżej 1, podczas gdy każda wartość LR powyżej 1 jest traktowana jako odpowiedź fałszywie pozytywna. Podczas ustalania poziomu odpowiedzi fałszywie pozytywnych liczba wykonanych porównań (N_2) jest w typowych eksperymentach równa liczbie kombinacji dwuelementowych (bez powtórzeń) możliwych do ułożenia z próbek znajdujących się w bazie danych, tj. $N_2 = \binom{m}{2} = \frac{m(m-1)}{2}$, gdzie m stanowi liczbę próbek w bazie danych.

Procent odpowiedzi fałszywie negatywnych wyznacza się natomiast porównując wyniki uzyskane w trakcie analizy próbek pobranych z tego samego obiektu. W takim przypadku wyniki uzyskane dla danej próbki dzielone są na dwa zbiory, z których jeden pełni rolę próbki dowodowej, a drugi próbki porównawczej. Ponieważ w trakcie eksperymentu porównywane są wyniki dotyczące kolejnych powtórzeń uzyskanych dla tej samej próbki (konkretnej powłoki lakierowej) poprawną odpowiedź stanowi wartość LR powyżej 1, podczas gdy każda wartość LR poniżej 1 traktowana jest jako odpowiedź fałszywie negatywna. Przy ustalaniu poziomu odpowiedzi fałszywie negatywnych liczba wykonanych porównań (N_1) jest w typowych eksperymentach zwyczajowo równa liczbie próbek znajdujących się w bazie danych ($N_1=m$).

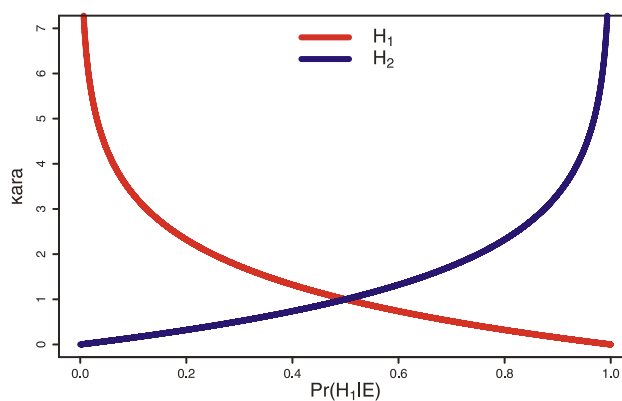
Należy zaznaczyć, iż w przypadku opiniowania dla potrzeb wymiaru sprawiedliwości, w przypadku rozwiązywania problemu porównawczego, szczególnej kontroli powinien podlegać poziom odpowiedzi fałszywie pozytywnych, gdyż wystąpienie tego błędu może skutkować oskarżeniem niewinnej osoby (Zadora 2015).

4.2.2 Empiryczna Entropia Krzyżowa – ilościowa ocena poprawności działania modeli LR

Sprawdzenie poprawności działania modeli *LR* powinno obejmować nie tylko ustalenie poziomu odpowiedzi błędnych, ale również ocenę siły wsparcia dla testowanych hipotez (Ramos 2007, Zadora i in. 2014). W idealnym przypadku, gdy model *LR* dostarcza prawidłowej odpowiedzi, to siła wsparcia dla poprawnej hipotezy powinna być jak największa, tj. gdy H_1 jest prawidłowa, to wartości *LR* powinny zmierzać do nieskończoności, podczas gdy dla prawidłowej H_2 powinny zmierzać do 0. Zdarza się jednak, że dany model *LR* dostarcza błędnej odpowiedzi ($LR > 1$, kiedy wsparta powinna być hipoteza H_2 oraz $LR < 1$, kiedy wsparta powinna być hipoteza H_1). W takim przypadku oczekuje się, aby siła wsparcia dla niepoprawnej hipotezy była jak najmniejsza, a więc, aby uzyskiwane wartości *LR* koncentrowały się w okolicy wartości progowej, tj. $LR=1$.

Metodą, która pozwala w sposób ilościowy ocenić poprawność działania modeli *LR* jest Empiryczna Entropia Krzyżowa (*ECE*) oparta na teorii informacji. Podstawą tej metody jest system karania i nagradzania odpowiedzi dostarczanych przez dany model *LR*, zgodnie z regułą *logarithmic scoring* (*LS*; rys. 3), tj.:

- a) jeżeli H_1 jest prawidłowa wówczas: $-\log_2 \Pr(H_1|E)$,
- b) jeżeli H_2 jest prawidłowa wówczas: $-\log_2 \Pr(H_2|E)$.



Rys. 3. Wykres przedstawiający regułą *logarithmic scoring* wykorzystywaną w ocenie poprawności działania modeli LR.

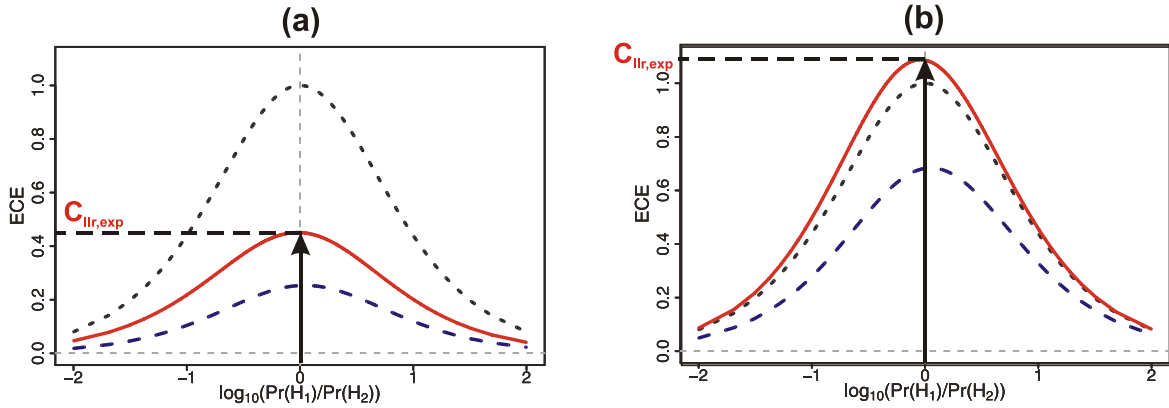
Całkowita kara przypisana modelowi wyznaczana jest jako średnia ważona wszystkich wartości kar przypisanych dla odpowiedzi błędnych (im mocniej wartość *LR* wspiera błędną hipotezę tym obarczona jest większą karą), gdy rozważane są hipotezy H_1 i H_2 zgodnie z równanie:

$$LS = \frac{1}{N_1} \sum_{i=1}^{N_1} \log_2 \left(1 + \frac{1}{LR_i \cdot \frac{\Pr(H_1)}{\Pr(H_2)}} \right) + \frac{1}{N_2} \sum_{j=1}^{N_2} \log_2 \left(1 + LR_j \cdot \frac{\Pr(H_2)}{\Pr(H_1)} \right),$$

gdzie N_1 i N_2 dotyczą odpowiednio liczby eksperymentów wykonanych w celu wyznaczenia poziomu odpowiedzi fałszywie negatywnych i fałszywie pozytywnych (podczas rozważania hipotez H_1 i H_2). Wartość Empirycznej Entropii Krzyżowej stanowi modyfikację całkowitej kary przypisanej modelowi (LS) poprzez wartość prawdopodobieństwa *a priori* ($\Pr(H_1)$ i $\Pr(H_2)$) zgodnie ze wzorem:

$$ECE = \frac{\Pr(H_1)}{N_1} \sum_{i=1}^{N_1} \log_2 \left(1 + \frac{1}{LR_i \cdot \frac{\Pr(H_1)}{\Pr(H_2)}} \right) + \frac{\Pr(H_2)}{N_2} \sum_{j=1}^{N_2} \log_2 \left(1 + LR_j \cdot \frac{\Pr(H_2)}{\Pr(H_1)} \right).$$

Ponieważ wartość prawdopodobieństw *a priori* $\Pr(H_1)$ i $\Pr(H_2)$ nie jest zwykle znana biegłemu sądowemu i zależy od informacji dostarczanych przez świadków, policję, czy też wynika z innych dowodów badanych w sprawie, to w praktyce wartość ECE wyznacza się dla każdej możliwej wartości stosunku prawdopodobieństw *a priori*, a następnie wykreśla się krzywą ECE jako funkcję logarytmu dziesiętnego ze stosunku tych prawdopodobieństw $\frac{\Pr(H_1)}{\Pr(H_2)}$ (rys. 4).



Rys. 4. Przykłady wykresów Empirycznej Entropii Krzyżowej (ECE) – opis w tekście.

Poprawność działania testowanego modelu LR określa się poprzez analizę położenia krzywej ECE wyznaczonej dla danych eksperymentalnych (linia czerwona) względem dwóch pozostałych krzywych:

- a) krzywej neutralnej (linia czarna), która obrazuje sytuację, w której model nie wspiera żadnej z testowanych hipotez ($LR=1$),

b) krzywej skalibrowanej (linia niebieska), która przedstawia wartości *ECE* uzyskane dla danych eksperymentalnych, które zostały dodatkowo skalibrowane z wykorzystaniem algorytmu *Pool Adjacent Violators (PAV)* (Ramos 2007, Zadora i in. 2014).

Najlepszy model to taki, dla którego krzywa *ECE* (linia czerwona) pokrywa się z krzywą skalibrowaną, a obie krzywe leżą jak najbliżej osi X (rys. 4a). W przypadku, gdy model wspiera silnie błędne odpowiedzi krzywa *ECE* „rośnie”, przy czym im bliżej krzywej neutralnej znajduje się, tym więcej informacji zostaje utraconych i tym mniejsze zaufanie do modelu użytego do oceny wartości dowodowej próbek. Najgorsza sytuacja (najgorszy model) występuje wówczas, gdy krzywa *ECE* (czerwona linia, rys. 4b) znajduje się powyżej krzywej neutralnej. Oznacza to, iż sposób interpretacji danych z wykorzystaniem testowanego modelu *LR* wprowadza więcej błędnych informacji, niż gdyby bez prowadzenia jakichkolwiek badań neutralnie stwierdzić, że bez względu na założone prawdopodobieństwa *a priori* dowód nie wspiera żadnej z hipotez ($LR=1$). Stąd model, dla którego *ECE* znajduje się powyżej krzywej neutralnej powinien zostać odrzucony. Niemniej jednak należy wziąć pod uwagę fakt, iż *ECE* w dużej mierze zależy od wielkości bazy danych (Ramos 2007, Zadora i in. 2014). W przypadku sprawdzania poprawności modelu na małym zbiorze, do wyników *ECE* należy podchodzić z ostrożnością.

5. Cel pracy

Celem pracy była ocena przydatności spektroskopii Ramana w analizie porównawczej niebieskich lakierów samochodowych prowadzonej dla potrzeb wymiaru sprawiedliwości.

Aby zrealizować ustalony cel zaplanowano i zrealizowano szereg eksperymentów, które obejmowały:

1. Identyfikację rodzaju pigmentów odpowiedzialnych za barwę i odcień niebieskich lakierów samochodowych, w tym ustalenie częstości występowania danego składu pigmentowego w przebadanej grupie próbek lakierów typu metalik i niemetalik.
2. Ocenę możliwości dyskryminacyjnych metody spektroskopii Ramana przy wykorzystaniu wciąż szeroko praktykowanego wizualnego porównania widm.
3. Opracowanie schematu interpretacyjnego widm Ramana bazującego na metodach statystycznych i chemometrycznych.
4. Identyfikację i optymalizację parametru metody spektroskopii Ramana (tj. powiększenia obiektywu, przez który ogniskowany jest laser na powierzchni próbki), który może mieć wpływ na powtarzalność i zmienność widm rejestrowanych dla niehomogenicznych próbek, do których należą niebieskie lakiery samochodowe.
5. Ocenę przydatności metody wstępnego naświetlania (*photobleaching*) oraz jej efektywności w uzyskiwaniu informatywnych widm Ramana dla lakierów samochodowych, które w standardowych pomiarach ramanowskich wykazywały jedynie fluorescencję lub fluorescencja dominowała w ich widmach uniemożliwiając identyfikację pigmentów.
6. Ocenę czynników, które mogą mieć wpływ na interpretację widm Ramana w ramach problemu porównawczego rozwiązywanego z wykorzystaniem podejścia ilorazu wiarygodności, w tym wpływu powiększenia obiektywu stosowanego do ogniskowania się lasera na powierzchni próbki, jak również parametrów metody naświetlania tj. mocy lasera i czasu naświetlania próbki.

CZĘŚĆ EKSPERYMENTALA

6. Przedmiot badań

Przedmiot badań stanowiły próbki niebieskich lakierów samochodowych, różniące się odcieniem, których kolekcję zgromadzono na przestrzeni 7 lat. Badaniom poddano zarówno lakiery typu niemetalik jak i metalik. Liczba i rodzaj analizowanych próbek różniły się w zależności od rozwiązywanego problemu. W sumie przeanalizowano 72 niebieskie lakiery samochodowe, w tym 32 typu niemetalik i 40 typu metalik. Spis analizowanych próbek wraz z informacją, w których eksperymentach były wykorzystywane zamieszczono w tabelach A1 oraz A2 (Załącznik A).

7. Metodyka badań

Widma ramanowskie rejestrowano wykorzystując spektrometr ramanowski InVia firmy Renishaw wyposażony w mikroskop DM2500 firmy Leica oraz trzy niezależne źródła wzbudzania: gazowy laser argonowy o długości linii wzbudzającej 514,5 nm, gazowy laser helowo-neonowy (632,8 nm) oraz półprzewodnikowy laser podczerwony o długości linii wzbudzającej 785 nm. Dla lasera argonowego wykorzystywano siatkę dyfrakcyjną posiadającą 2400 linii/mm, podczas gdy dla pozostałych dwóch źródeł wzbudzania siatkę dyfrakcyjną zawierającą 1200 linii/mm. Podczas pomiarów ramanowskich wykorzystujących jako źródło wzbudzania próbki laser argonowy bądź helowo-neonowy stosowano 1%, bądź 5% maksymalnej mocy lasera, która mierzona na obiektywie 50× wynosiła odpowiednio 15,5 mW dla 514,5 nm, bądź 7,6 mW dla lasera 632,8 nm. Dla lasera 785 nm wykorzystywano 0,5% lub 1% maksymalnej mocy tego źródła (68 mW). Sygnał rejestrowano za pomocą kamery CCD. Wszystkie próbki analizowano bez ich wstępnego przygotowania (tzw. pomiary *in situ*). Widma ramanowskie rejestrowano między 200 a 2500 cm^{-1} , który w całości pokrywał zakres spektralny, w którym mogą zostać ujawnione pasma pochodzące od pigmentów (Suzuki i Carrabba 2001, de Gelder i in. 2005). Pomiary prowadzono przy czasie naświetlania 10 s i liczbie akumulacji od 3 do 5. Dla każdego lakieru pomiar wykonywano co najmniej w 3 różnych miejscach. W większości eksperymentów (Zięba-Palus i Michalska 2014a, Zięba-Palus i Michalska 2014b, Michalska i in. 2015, Martyna i in. 2015, Martyna i in. 2016) do ogniskowania się na powierzchni próbki wykorzystywano 50× powiększający obiektyw (apertura numeryczna obiektywu N.A.= 0,75), który, jest najczęściej stosowany w pomiarach ramanowskich, i dla którego wielkość wiązki laserowej oddziaływującej z próbką wynosi ok. 1 lub 2 μm , w zależności od stosowanej długości lasera. W eksperymentach, w których oceniano wpływ powiększenia obiektywu (Michalska i in. 2017) do ogniskowania się na powierzchni próbki wykorzystywano trzy różne powiększenia obiektywu, tj. 20× (N.A.=0,4), 50× (N.A.=0,75) oraz 100× (N.A.=0,85). Wstępną analizę widm prowadzono z wykorzystaniem oprogramowania Wire 3.2 firmy Renishaw.

8. Zastosowanie spektroskopii Ramana w badaniu niebieskich lakierów samochodowych

Zastosowanie każdej metody analitycznej w badaniach porównawczych wymaga sprawdzenia jej siły dyskryminacyjnej w różnicowaniu próbek należących do tej samej kategorii (Zadora i in. 2014). W przypadku próbek lakierowych dla dużej bazy danych możliwości dyskryminacyjne spektroskopii Ramana oceniono dotychczas dla grupy zielonych (Zięba-Palus i Wąs-Gubała 2011) i czerwonych (Massonnet i Stoecklein 1999c) lakierów samochodowych, a także dla fioletowych (Bell i in. 2005) farb malarskich oraz czerwonych (Muehlethaler i in. 2011) i zielonych farb w sprayu (Buzzini i Massonnet 2004). W części opisanych badań (Buzzini i Massonnet 2004, Massonnet i Stoecklein 1999c, Zięba-Palus i Wąs-Gubała 2011) siłę dyskryminacyjną metody oceniano wyłącznie poprzez wizualne porównanie widm.

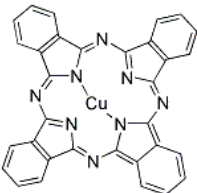
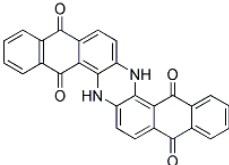
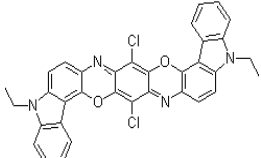
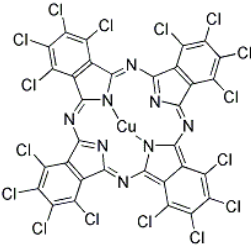
W badaniach prowadzonych przez Autorkę spektroskopia Ramana została zastosowana do grupy niebieskich lakierów samochodowych, przy czym analizie poddano zarówno lakiery typu metalik, jak i niemetalik. W pierwszej kolejności przeprowadzono badania identyfikacyjne mające na celu ustalenie, jakie pigmenty determinują barwę badanych lakierów oraz jaka jest częstość występowania danego składu pigmentowego w rozpatrywanej populacji próbek (punkt 8.1). W dalszej części badań oceniano siłę dyskryminacyjną metody wykorzystując powszechnie praktykowane wizualne porównanie widm (punkt 8.2.1). Następnie dla lakierów opisanych przez widma uzyskane przy wykorzystaniu lasera półprzewodnikowego podczerwonego (785 nm) problem porównawczy rozwiązano w oparciu o testy ilorazu wiarygodności (punkt 8.2.2). Ponieważ uznano, iż nawet w przypadku niewielkiego odłamka lakierowego możliwe jest odróżnienie obu typów lakierów, w każdym z zastosowanych podejść obie grupy próbek rozpatrywano oddzielnie. Kolejny etap badań obejmował ocenę wpływu powiększenia obiektywu na zmienność uzyskiwanych widm, w przypadku niehomogenicznych próbek, do których należą lakiery samochodowe. Ocenie poddano również wpływ tego parametru na rozwiązanie problemu porównawczego z wykorzystaniem podejścia ilorazu wiarygodności (punkt 8.3). Ostatni etap badań dotyczył oceny przydatności procesu wstępnego naświetlania (*photobleaching*) oraz jego efektywności w uzyskiwaniu informatywnych widm Ramana, dla lakierów, które w standardowych pomiarach ramanowskich wykazywały jedynie fluorescencję, bądź fluorescencja dominowała w ich widmach. Badania objęły również ocenę, czy parametry tego procesu (moc lasera, czas naświetlania) mogą mieć wpływ na wnioskowanie w obrębie problemu porównawczego rozwiązywanego z wykorzystaniem testu ilorazu wiarygodności (punkt 8.4).

8.1 Identyfikacja pigmentów

W pierwszej kolejności, na podstawie widm Ramana uzyskanych z wykorzystaniem trzech źródeł wzbudzania, przeprowadzono badania identyfikacyjne, których celem było uzyskanie informacji o rodzaju pigmentów determinujących kolor i odcień niebieskich

lakierów samochodowych (wykaz próbek wykorzystywanych w badaniach zamieszczono w tabelach A1 i A2 w Załączniku A – *Eksperyment 1*, rys. 5 i 6). Wykorzystując widma wzorców, jak i dane literaturowe (de Gelder i in. 2005, Suzuki i Carrabba 2001), w badanych próbkach zidentyfikowano w sumie siedem rodzajów pigmentów, których charakterystykę zamieszczono w tabeli 1. Błękit pruski (PB 27) identyfikowany w niebieskich lakierach samochodowych przez innych naukowców (Suzuki i Carrabba 2001, Ryland i in. 2006) nie został wykryty w żadnej z nich. Ponadto, w przypadku jednej próbki lakieru typu metalik (rys. 6) zastosowana procedura nie pozwoliła na uzyskanie informacji o pigmentach, ze względu na problem fluorescencji pojawiający się dla każdego z użytych źródeł wzbudzenia.

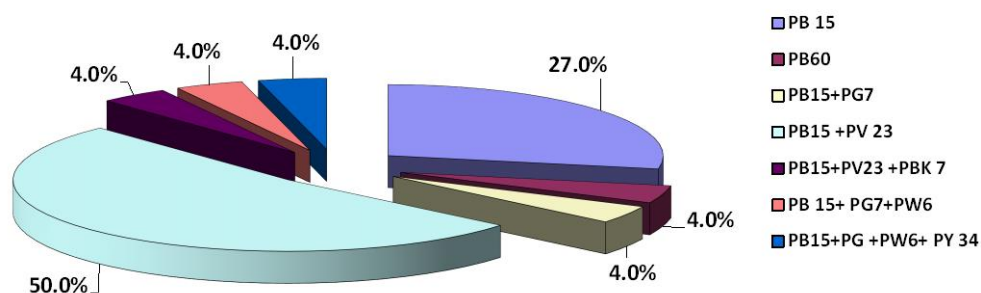
Tabela 1. Pigmenty zidentyfikowane w niebieskich lakierach samochodowych. Tabela 2 w publikacji **Zięba-Palus i Michalska (2014a)**.

Nazwa pigmentu wg C.I. ^{a)}	Nazwa chemiczna	Wzór związku	Charakterystyczne pasma Ramana [cm ⁻¹]
PW 6	biel tytanowa	TiO ₂ (forma krystaliczna rutyl)	455, 610
PY 34	żółcień chromowa	PbCrO ₄	358, 376, 402, 840
PB 15	ftalocyjanina miedzi		590, 680, 748, 1341, 1452, 1529
PB 60	błękit indantrenowy RS		1282, 1300, 1330, 1355, 1382, 1617
PV 23	<i>Dioxazine Violet</i>		1345, 1391, 1430
PG 7	polichlorowana ftalocyjanina miedzi		685, 740, 776, 817 1280, 1337, 1536
PBK 7	węgiel amorficzny		1325, 1580

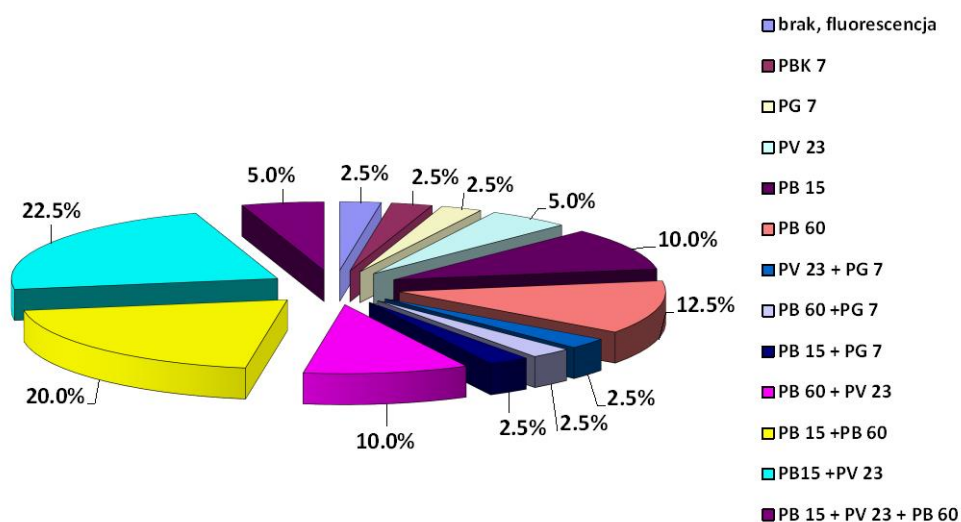
a) nazwa pigmentu według Międzynarodowego Indeksu barw (C.I.).

Rozpatrując obie grupy lakierów oddzielnie stwierdzono, że choć praktycznie te same pigmenty są stosowane w obu typach lakierów (rys. 5 i 6), to niektóre z nich są częściej

spotykane w lakierach typu metalik niż typu niemetalik. Przykładowo błękit indantrenowy RS (PB 60) zidentyfikowano tylko w jednej próbce lakieru typu niemetalik (4% przebadanej populacji; rys. 5), podczas gdy w grupie lakierów typu metalik sam lub łącznie z innymi pigmentami został zidentyfikowany w połowie lakierów poddanych analizie (rys. 5 i 6). Ponadto, pomimo występowania tych samych pigmentów w obu grupach próbek, zdecydowanie większa różnorodność ich połączeń obserwowana była w grupie lakierów typu metalik (12 klas, rys. 6) niż typu niemetalik (7 klas, rys. 5).



Rys. 5. Częstość występowania danego składu pigmentowego w przebadanej populacji niebieskich lakierów samochodowych typu niemetalik, ustalona na podstawie widm Ramana zarejestrowanych przy zastosowaniu trzech źródeł wzbudzenia (liczba próbek w bazie danych $m=26$; szczegóły dotyczące pigmentów, np. PB 15, umieszczono w tabeli 1).



Rys. 6. Częstość występowania danego składu pigmentowego w przebadanej populacji niebieskich lakierów samochodowych typu metalik ustalona na podstawie widm Ramana zarejestrowanych przy zastosowaniu trzech źródeł wzbudzenia (liczba próbek w bazie danych $m=40$; szczegóły dotyczące pigmentów, np. PB 60, umieszczono w tabeli 1).

Ponadto ustalono, że za barwę i odcień niebieskich lakierów samochodowych zwykle odpowiedzialny jest jeden lub dwa pigmenty (niezależnie od typu lakieru), a zastosowanie mieszaniny trzech lub czterech pigmentów należy do rzadkości. Głównym pigmentem odpowiedzialnym za kolor niebieskich lakierów samochodowych wydaje się być ftalocyjanina miedzi (PB 15), podczas gdy pozostałe pigmenty są prawdopodobnie dodawane w celu uzyskania pożądanego odcienia koloru. Chlorowana ftalocyjanina miedzi (PG 7) bądź żółcień chromowa (PY 34) dodawane są w celu uzyskania zielonego odcienia, podczas gdy połączenie błękitu indantrenowego RS (PB 60) lub *dioxazine Violet* (PV 23) z ftalocyjaniną miedzi pozwala uzyskać czerwony odcień niebieskiego. Oba pigmenty (PV 23 i PB 60) posiadają podobne właściwości (Thomson 2009), stąd ich jednoczesne występowanie w lakierze powinno być stosunkowo rzadkie. Niemniej jednak takie połączenie pigmentów zidentyfikowano aż w 6 próbkach lakierów typu metalik co stanowiło 15% przebadanej populacji.

8.2 Wartość dowodowa widm Ramana

8.2.1 Wizualne porównanie widm

Stosując wizualne porównanie widm, siłę dyskryminacyjną metody wyznaczono dla każdego z użytych źródeł wzbudzania, a następnie obliczono całkowitą siłę dyskryminacyjną metody biorąc pod uwagę informacje uzyskane z 3 różnych źródeł wzbudzania, tj. laserów 514,5 nm, 632,8 nm oraz 785 nm. Uzyskane wyniki dotyczą próbek lakierów oznaczonych w tabelach A1 i A2 (Załącznik A) jako *Eksperyment 1*.

W pierwszej kolejności wyznaczano procent odpowiedzi fałszywie pozytywnych (F_p ; punkt 4.2.1). Widma ramanowskie dla wybranej linii wzbudzania w obrębie wybranej bazy danych uzyskane dla różnych lakierów porównywano parami poprzez ich nałożenie w programie Wire 3.2 i ocenienie, w ilu przypadkach wizualne porównanie widm nie pozwala na rozróżnienie tych próbek. Następnie podjęto próbę wyznaczenia poziomu odpowiedzi fałszywie negatywnych (F_n ; punkt. 4.2.1) porównując parami kolejne powtórzenia uzyskane dla wybranej próbki lakieru. Ustalono, iż widma będące kolejnymi powtórzeniami nie wykazują różnic zarówno w obecności dodatkowych pasm, jak i w stosunku intensywności wybranych pasm wskazujących na odmienną zawartość procentową pigmentów. Niemniej w porównywanych widmach były sporadycznie obserwowane subtelne różnice. Stwierdzono jednak, że w przypadku realnej ekspertyzy takie różnice w widmach między próbką dowodową a porównawczą nie byłyby wystarczające, aby zdecydować o różnym pochodzeniu obu próbek. Stąd uznano, iż wizualne porównanie widm nie pozwala wyznaczyć poziomu odpowiedzi fałszywie negatywnych.

Dla analizowanych próbek wyniki dotyczące siły dyskryminacyjnej metody ($DP[\%] = 100[\%] - F_p[\%]$) w zależności od użytej linii wzbudzania i rozpatrywanej bazy

danych, jak również informacja o łącznej sile dyskryminacyjnej metody dla obu typów lakierów zamieszczono w tabeli 2.

Tabela 2. Siła dyskryminacyjna (*DP*) metody spektroskopii Ramana dla próbek niebieskich lakierów samochodowych wyznaczona w oparciu o wizualne porównanie widm.

Laser	Siła dyskryminacyjna (<i>DP</i>)	
	Lakiery niemetalik	Lakiery metalik
514,5 nm	72,6%	74,6%
632,8 nm	79,1%	95,5%
785 nm	84,9%	95,4%
Łącznie	91,7%	98,9%

Najlepsze rozróżnienie próbek (najmniejszy poziom odpowiedzi fałszywie pozytywnych) zarówno dla lakierów typu metalik, jak i niemetalik, uzyskano przy zastosowaniu jako źródła wzbudzania półprzewodnikowego lasera podczerwonego o długości linii wzbudzającej 785 nm. Przy czym dla lakierów typu metalik podobne rezultaty uzyskano również stosując laser helowo-neonowy (632,8 nm). Najgorsze rozróżnienie lakierów, w obrębie obu rozpatrywanych baz danych, dostarczały widma uzyskane przy zastosowaniu jako źródła wzbudzania lasera argonowego (514,5 nm). Tak słabe wyniki dla widm zarejestrowanych przy tej linii wzbudzającej były związane głównie z obecnością fluorescencji, która w większości przypadków maskowała słabszy sygnał ramanowski uniemożliwiając zarówno identyfikację pigmentów, jak i różnicowanie próbek, na podstawie porównania ich widm.

8.2.2 Podejście ilorazu wiarygodności

W literaturze przedmiotu można znaleźć nieliczne doniesienia związane z zastosowaniem w naukach sądowych metod chemometrycznych w różnicowaniu próbek opisanych przez widma Ramana. Dotychczas opisano m.in. metodę analizy czynników głównych (*PCA*) wykorzystaną w różnicowaniu fioletowych farb malarskich (Bell i in. 2005), farb temperowych (Navas i in. 2010), bądź nielicznych różnobarwnych próbek lakierów w spray'u (Muehlethaler i in. 2013). Dwie metody – *PCA* i hierarchiczna analiza skupień (*HCA*) zostały zastosowane w różnicowaniu czerwonych farb ściennych (Muehlethaler i in. 2011), podczas gdy liniowa analiza dyskryminacyjna (*LDA*) posłużyła do rozpoznawania i różnicowania polimorficznych odmian ftalocyjaniny miedzi (Defeyt i in. 2013). Podejście ilorazu wiarygodności, które preferowane jest w naukach sądowych (Aitken i Taroni 2004, Zadora i in. 2014), nie było wcześniej stosowane w ocenie wartości dowodowej widm Ramana.

W swoich pracach Autorka (Michalska i in. 2015, Martyna i in. 2015, Martyna i in. 2016) oceniała, czy podejście ilorazu wiarygodności można z powodzeniem zastosować do

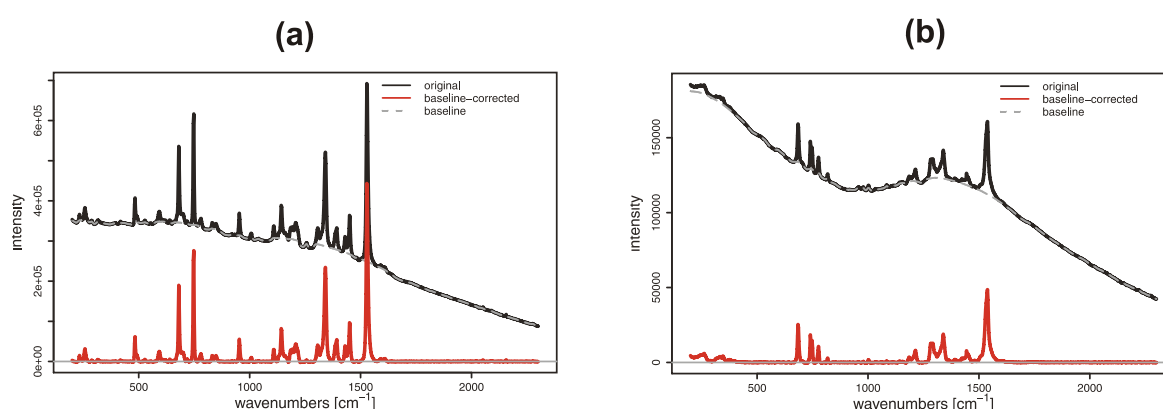
widm Ramana, w celu rozwiązania tzw. problemu porównawczego (rozdział 4). W pierwszej z prac (**Michalska i in. 2015**) problem wymiarowości widm został rozwiązany poprzez zastosowanie jako zmiennych pól powierzchni pod wybranymi pasmami, podczas gdy w drugiej (**Martyna i in. 2015**) wymiarowość widm zredukowano wykorzystując dyskretną transformację falkową. W trzecim z proponowanych podejść (**Martyna i in. 2016**) wymiarowości danych zmniejszono poprzez przekształcenie widm, tj. klasycznej reprezentacji zmiennych w reprezentację wzajemnych podobieństw próbek, którą następnie poddano liniowej analizie dyskryminacyjnej. Aby ocenić przydatność metod statystycznych wyniki uzyskane z zastosowaniem podejścia ilorazu wiarygodności i zmiennych będących polem powierzchni pod wybranymi pasmami (**Michalska i in. 2015**) porównano z wynikami uzyskanymi w trakcie powszechnie praktykowanego wizualnego porównywania widm. W pracy (**Michalska i in. 2015**) zaproponowano również metody wstępnego przygotowania widm, takie jak ich rekonstrukcja, czy korekcja linii bazowej wykonywana, w celu redukcji efektu fluorescencji, dla widm, w których pasma ramanowskie były widoczne. W badaniach wykorzystano widma Ramana zarejestrowane dla niebieskich lakierów samochodowych przy długości linii wzbudzającej 785 nm (wykaz próbek zamieszczono w Załączniku A w tabelach A1 i A2; *Eksperyment 2* dla modeli *LR* opartych o zmienne będące polem powierzchni pod wybranym pasmem; *Eksperyment 3* dla modeli *LR* opartych o zmienne pochodzące z *DWT*; *Eksperyment 4* dla modeli *LR* bazujących na funkcjach dyskryminacyjnych).

8.2.2.1 Przygotowanie widm

Widma Ramana rejestrowane w różne dni różniły się pomiędzy sobą zakresami liczb falowych, dla których mierzona była intensywność sygnału ramanowskiego. Ponadto, nawet w obrębie pojedynczego widma sygnał rejestrowany był ze zmiennym krokiem. Taka sytuacja uniemożliwiała opisanie wszystkich próbek (reprezentowanych przez widma) przez ten sam zestaw zmiennych. Stąd, aby rozwiązać ten problem wybrano stały zestaw zmiennych (1024 liczby falowe w zakresie między 200 – 2300 cm^{-1} , z krokiem co 2,053 cm^{-1}), a następnie w celu uzyskania brakujących informacji zaproponowano dwie metody rekonstrukcji widm: metodę interpolacji liniowej oraz funkcję sklejaną (**Michalska i in. 2015**).

W metodzie interpolacji liniowej intensywność sygnału ramanowskiego, dla każdej brakującej liczby falowej nowego zestawu zmiennych wyznaczano z równania prostej $y = ax + b$, podczas gdy w przypadku zastosowania funkcji sklejaney wykorzystano wielomian trzeciego stopnia, który dopasowywany był do danych surowych tak, by odtworzyć brakujące informacje o intensywności sygnału dla nowego zestawu zmiennych. Zastosowanie dwóch metod rekonstrukcji widm miało na celu zweryfikowanie, czy sposób rekonstrukcji, a więc wykorzystywanie danych po przetworzeniu (zamiast danych surowych), nie wpłynie na ocenę podobieństwa próbek z zastosowaniem podejścia ilorazu wiarygodności.

Widma zrekonstruowane poddano następnie korekcji linii bazowej. W tym celu zastosowano metodę ciągłej transformacji falkowej (CWT), która pozwoliła na rozdzielenie sygnału niskoczęstotliwościowego utożsamianego zwykle z fluorescencją od sygnału wysokoczęstotliwościowego stanowiącego sygnał ramanowski (rys. 7). Dryft linii bazowej usunięto stosując falkę *Mexican hat* (Daubechies 1990), przy czym dla każdego widma zastosowano ten sam zestaw parametrów CWT. Następnie widma znormalizowano tak, iż intensywność najwyższego pasma wynosiła 100 (Michalska i in. 2015), bądź, jak to miało miejsce w pracach Martyna i in. (2015, 2016), do normalizacji widm zastosowano transformację SNV (Standard Normal Variate).



Rys. 7. Przykłady widm ramanowskich zarejestrowanych dla lakieru: (a) typu niemetalik, (b) typu metalik – przed (widmo w kolorze czarnym) i po korekcji linii bazowej (widmo w kolorze czerwonym). Rysunek 1a w publikacji Michalska i in. (2015).

8.2.2.2 Redukcja wymiarowości przestrzeni danych

8.2.2.2.1 Zmienne typu *band area*

Wymiarowość widm Ramana, które zawierały po rekonstrukcji 1024 zmienne, zmniejszono zawężając zakres widmowy do kilku najbardziej charakterystycznych miejsc/pasm, w których rejestrowano sygnał pochodzący od pigmentów (Michalska i in. 2015). Tym samym liczbę zmiennych opisujących próbki lakierów typu niemetalik zmniejszono do 10, a dla lakierów typu metalik do 8 nowych zmiennych, będących polem powierzchni pod pasmem lub pasmami (*band area*; *BA*) w określonym zakresie liczb falowych (tabela 3).

Tabela 3. Zakres pasm wyselekcjonowanych do analizy. Nowe zmienne stanowiły pole powierzchni pod tymi pasmami. Tabela 1 w publikacji **Michalska i in. (2015)**.

Zmienna	Min [cm ⁻¹]	Max [cm ⁻¹]
Lakiery niemetalik		
PG7a	725	744
PG7e	807	824
PG7b	1270	1300
PG7c	760	790
PB15a	744	765
PB15b	1124	1177
PV23a	1370	1415
PV23b	1415	1440
PG7aPB15a	725	765
PB15cPG7d_2	1490	1565
Lakiery metalik		
PG7a1	735	744
PB15a	744	765
PB60a	790	810
PB15dPG7fPV23c	1333	1350
PB60b	1350	1370
PV23aPB60c	1370	1415
PV23b	1415	1440
PB15cPG7d_1	1490	1580

8.2.2.2.2 Zmienne wyselekcjonowane w wyniku zastosowania procedury DWT

W celu redukcji wymiarowości zrekonstruowane widma Ramana poddano dyskretnej transformacji falkowej wykorzystując jako funkcję macierzystą falkę Daubechies rzędu 5 -tego (**Martyna i in. 2015**). Dekompozycję widm prowadzono do trzeciego poziomu, przy czym dla współczynników szczegółów na pierwszym poziomie dekompozycji zastosowano twardy próg decyzyjny. Otrzymane współczynniki uszeregowano zgodnie z malejącą wariancją i wybrano jedynie te, których suma tłumaczyła ponad 99% procent całkowitej wariancji. W celu dalszej redukcji wymiarowości wybrano zmienne, których stosunek zmienności międzyobiektowej do wewnątrzobiektowej był większy niż 100. Ostatecznie, pod uwagę zostały wzięte tylko zmienne niosące informację chemiczną o pigmentach obecnych w analizowanych próbkach. Zastosowana procedura pozwoliła zmniejszyć wymiarowość widm Ramana z 1024 do 14 nowych zmiennych w przypadku lakierów typu niemetalik oraz 10 w przypadku lakierów typu metalik (tabela 4).

Tabela 4. Zmienne wytypowane w wyniku zastosowania procedury *DWT*. Tabela 2 w publikacji **Martyna i in. (2015)**.

Zmienna	Zakres spektralny [cm^{-1}]	Informacja chemiczna
Lakiery niemetalik		
V3_30	678 – 692	PB15, PG7 ^{b)}
V3_33	727 – 741	PG7
V3_46	940 – 955	PB15
V3_66	1269 – 1283	PG7
V3_68 ^{a)}	1301 – 1316	PB15
V3_73	1383 – 1398	PV23
V3_77	1449 – 1463	PB15
W3_18	481 – 495	PB15, PV23
W3_30	678 – 692	PB15
W3_33	727 – 741	PG7
W3_66	1269 – 1283	PG7
W3_77	1449 – 1463	PB15
W3_82	1531 – 1545	PB15, PG7
W2_67	743 – 750	PB15, PG7
Lakiery metalik		
V3_30	678 – 692	PB15, PG7
V3_66 ¹	1269 – 1283	PB60, PV23
V3_68	1301 – 1317	PB60
V3_69	1318 – 1333	PB60
V3_70	1334 – 1348	PB15
W3_33	727 – 741	PG7
W3_71	1350 – 1366	PB60
W3_72	1367 – 1382	PB60, PV23
W3_73	1383 – 1398	PV23
W2_67	743 – 750	PB15

a) zmienna wytypowana tylko dla widm zrekonstruowanych za pomocą funkcji sklejaney,

b) szczegóły dotyczące pigmentów, np. PB15, umieszczono w tabeli 1.

8.2.2.2.3 Zmienne wyselekcjonowane w wyniku zastosowania procedury *DR-LDA*

W tym podejściu (**Martyna i in. 2016**) wykorzystano widma Ramana zrekonstruowane za pomocą funkcji sklejaney. Na wstępie zawężono zakres spektralny widm z 200–2300 cm^{-1} do 380–2300 cm^{-1} , co ograniczyło liczbę zmiennych z 1024 do 936 zmiennych. Następnie widma przekształcono w reprezentację wzajemnego podobieństwa próbek poprzez zastąpienie każdego z nich wektorem jego odległości od zdefiniowanego zestawu widm referencyjnych. Jako miary podobieństwa wykorzystano odległości Manhattan, Euklidesa, kwadrat odległości Euklidesa, odległość Czebyszewa oraz opartą o współczynnik korelacji Pearsona. Następnie dzięki założeniu, iż widma uzyskane dla konkretnej próbki lakierowej stanowią oddzielną klasę możliwe było poddanie widm w reprezentacji wzajemnych podobieństw próbek liniowej analizie dyskryminacyjnej. Dzięki własności metody LDA, która maksymalizuje zmienność międzyobiektołą jednocześnie minimalizując zmienność wewnątrzobiektołą, możliwe było wybranie kilku pierwszych funkcji dyskryminacyjnych, które tłumaczyły największą część

wariancji związanej z grupowaniem próbek, co bezpośrednio wpłynęło na dalszą redukcję wymiarowości danych. Optymalizacja stosunku zmienności międzyobiektowej do wewnątrzobiektowej, która stanowi również wymóg wyboru istotnych zmiennych przy wykorzystaniu podejścia ilorazu wiarygodności pozwoliła ponadto na bezpośrednie wykorzystanie funkcji dyskryminacyjnych do konstrukcji modeli *LR*.

Ze względu na fakt, iż dysponowano względnie małymi bazami danych złożonymi z niewielkiej, jak i nierównej liczby widm zarejestrowanych dla próbek (od 3 do 7 powtórzeń dla danego lakieru), to w celu jak najlepszego wykorzystania informacji zawartych w tych bazach, zaproponowano następującą procedurę walidacji. 30 lakierów znajdujących się w obrębie każdej bazy danych podzielono na trzy zestawy, każdy złożony z widm 10 losowo wybranych próbek, tj. zestaw widm referencyjnych reprezentowany przez średnie widma uzyskane dla tych próbek, zestaw uczący oraz zestaw testowy. Przy czym, każdy z zestawów wygenerowano 100 krotnie. Schemat ilustrujący tę procedurę walidacji zamieszczono na rysunku 3 w publikacji **Martyna i in. (2016)**.

8.2.2.3 Modele ilorazu wiarygodności

W pracach (**Michalska i in. 2015**, **Martyna i in. 2015**) dla każdej grupy próbek (lakieru typu niemetalik i metalik rozpatrywane oddzielnie) w zależności od zastosowanej metody rekonstrukcji widm testowano następujące modele *LR*:

- a) jednowymiarowe oparte na pojedynczej zmiennej (informacji chemicznej o wybranym pigmentcie),
- b) wielowymiarowe naiwne, do konstrukcji których wykorzystano jak najmniej skorelowane zmienne, które zawierały informacje o możliwie największej liczbie pigmentów,
- c) wielowymiarowe konstruowane ze zmiennych wykazujących wysoki stopień korelacji i dostarczających informacji o jak największej liczbie pigmentów.

Do konstrukcji modeli wielowymiarowych, punkty (b) i (c), wybierano zmienne dostarczające stosunkowo niewielkiej liczby odpowiedzi fałszywych, gdy wykorzystywano je jako modele jednowymiarowe.

W pracy (**Martyna i in. 2016**) do konstrukcji modeli *LR* wykorzystano funkcje dyskryminacyjne. Dzięki jednej z własności metody LDA, tj. ortogonalności funkcji dyskryminacyjnych (*LD*), a więc spełnieniu kryterium niezależności zmiennych, możliwe było zaproponowanie modeli naiwnych, w których liczbę zmiennych wytypowano na podstawie algorytmu opartego na Bayesowskim kryterium informacji (*BIC*).

Poprawność działania modeli *LR* konstruowanych zarówno dla zmiennych będących polem powierzchni pod wybranymi pasmami (modele *LR-BA*), zmiennych wyselekcjonowanych po zastosowaniu procedury dyskretnej transformacji falkowej (modele *LR-DWT*), jak również tych uzyskanych w wyniku wykorzystania reprezentacji wzajemnych

podobieństw próbek wspartych analizą *LDA* (modele *LR-DR-LDA*) oceniano poprzez ustalenie poziomu odpowiedzi błędnych oraz wykorzystaniu podejścia Empirycznej Entropii Krzyżowej (Zadora i in. 2014; punkt 4.2).

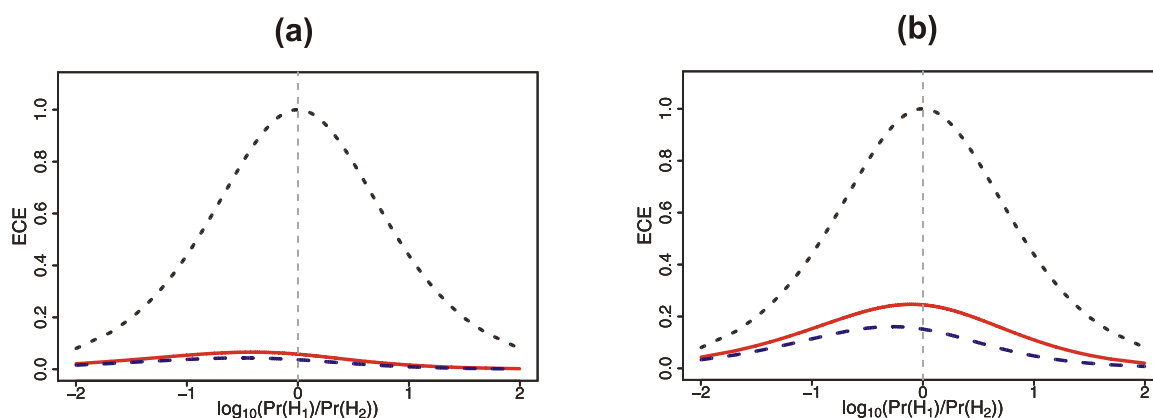
8.2.2.3.1 Wyniki uzyskane dla modeli *LR-BA*

Najlepsze wyniki (Michalska i in. 2015) dla grupy niebieskich lakierów samochodowych typu niemetalik z wykorzystaniem modeli jednowymiarowych uzyskano dla czterech zmiennych tj.: PG7a, PG7b, PG7aPB15a, i PB15cPG7d_2 (tabela 3), dla których procent odpowiedzi fałszywie pozytywnych i negatywnych (pkt. 4.2.1) nie przekraczał 10% (tabela 5). Wykresy Empirycznej Entropii Krzyżowej potwierdziły poprawność ich działania, przy czym najlepsze dopasowanie (najmniejszy stopień utraty informacji – najmniejsze wartości $C_{llr,exp}$; definicje $C_{llr,exp}$ zilustrowano na rys. 4) uzyskano dla trzech z nich, tj.: PG7a i PG7aPB15a oraz PB15cPG7d_2, dla widm zrekonstruowanych z zastosowaniem funkcji sklepanych ($C_{llr,exp} = 28\%$), bądź dwóch z nich PG7a i PG7aPB15a ($C_{llr,exp} = 22\%$), gdy wykorzystywano widma zrekonstruowane za pomocą interpolacji liniowej.

W przypadku lakierów typu metalik ocenianych w oparciu o modele jednowymiarowe uzyskiwano nieco gorsze rezultaty (wyższy poziom odpowiedzi błędnych, gorszy przebieg wykresów *ECE*), co może być podyktowane obecnością płatków aluminium, bądź miki w warstwie bazowej tych lakierów, która to może wpływać zarówno na jakość widm (stosunek sygnału do szumu), jak i ich powtarzalność. Niemniej jednak, wśród zaproponowanych modeli jednowymiarowych najlepsze okazały się te oparte na zmiennej PB60b czy PV23aPB60c (tabele 3 i 5). Wykresy *ECE* potwierdziły, że utrata informacji dla tych dwóch modeli jest najmniejsza ($C_{llr,exp}$ w przedziale 33-38%) bez względu na rodzaj zastosowanej metody rekonstrukcji widm.

Zastosowanie modeli dwuwymiarowych, w tym modeli naiwnych, w ocenie wartości dowodowej lakierów zarówno typu metalik, jak i niemetalik, na podstawie ich widm Ramana wpłynęło na zmniejszenie poziomu odpowiedzi fałszywie pozytywnych w stosunku do modeli jednowymiarowych. Nie wpłynęło to natomiast na poziom odpowiedzi fałszywie negatywnych (tabela 5). Wykresy *ECE* uzyskiwane dla modeli wielowymiarowych nie zawsze okazywały się być lepsze niż wykresy *ECE* dla modeli jednowymiarowych. Niemniej jednak, biorąc pod uwagę poziom odpowiedzi błędnych (tabela 5), jak i wykresy *ECE* (rys. 8), w ocenie wartości dowodowej lakierów typu niemetalik najlepszy okazał się model naiwny oparty na zmiennych będących polami powierzchni pod pasmami w zakresie ($725-765\text{ cm}^{-1}$ i $1370-1415\text{ cm}^{-1}$; tabela 5 oraz rys. 8a), a dla lakierów typu metalik model dwuwymiarowy oparty na zmiennych będących polem powierzchni pod pasmami leżącymi w zakresie ($1333-1350\text{ cm}^{-1}$ oraz $1370-1415\text{ cm}^{-1}$; tabela 5 oraz rys. 8b).

Uzyskane wyniki pozwoliły również stwierdzić, iż sposób rekonstrukcji widm nie wpływa znacząco na uzyskiwane wartości LR . Stąd można je z powodzeniem stosować przygotowując widma Ramana do ich dalszej matematycznej obróbki.



Rys. 8. Wykres Empirycznej Entropii Krzyżowej (ECE) uzyskany dla: (a) wielowymiarowego naiwnego modelu LR opartego na zmiennych PG7aPB15a i PV23a w bazie danych lakierów typu niemetalik, (b) dwuwymiarowego modelu LR opartego na zmiennych PB60b oraz PB15dPG7fPV23c w bazie danych lakierów typu metalik. Linia czerwona – wykres ECE uzyskany dla eksperymentalnych wartości LR , linia czarna – wykres ECE uzyskany przy założeniu $LR=1$, linia niebieska – wykres ECE uzyskany dla eksperymentalnych wartości LR dodatkowo skalibrowanych z wykorzystaniem algorytmu PAV (szczegóły w pkt. 4.2.2). Rysunki pochodzą z publikacji (Michalska i in. 2015) – (a) to rys. 2b; (b) to rys. 2d.

Tabela 5. Poziom odpowiedzi fałszywie pozytywnych (Fp) i fałszywie negatywnych (Fn) dostarczanych przez testowane modele LR-BA.

Zmienne	Funkcja sklejana ^{a)}		Interpolacja liniowa ^{b)}	
	Fp [%]	Fn [%]	Fp[%]	Fn [%]
Lakiery typu niemetalik				
Modele jednowymiarowe				
PG7a ^{c)}	9,7	4,0	9,3	0,0
PG7e	30	12,0	27,3	12,0
PG7b	8,7	8,0	8,7	4,0
PG7c	13,7	4,0	13,3	0,0
PB15a	25,7	4,0	24,7	4,0
PB15b	20,7	8,0	20,7	0,0
PV23a	11,3	4,0	11,0	8,0
PV23b	12,0	0,0	13,3	4,0
PG7aPB15a	8,3	4,0	9,3	0,0
PB15cPG7d_2	8,3	4,0	9,0	8,0
Modele wielowymiarowe naiwne				
(PG7aPB15a), (PV23a)	1,3	4,0	1,3	0,0
(PV23a), (PB15cPG7d_2)	3,0	4,0	2,3	12,0
Modele dwuwymiarowe				
(PG7aPB15a, PB15cPG7d_2)	3,7	8,0	3,3	8,0
(PG7c, PG7aPB15a)	5,3	4,0	5,3	4,0
Lakiery typu metalik				
Modele jednowymiarowe				
PG7a1	16,1	10,0	16,3	10,0
PB15a	18,4	6,7	18,4	6,7
PB60a	26,0	3,3	25,5	3,3
PB15dPG7fPV23c	26,9	3,3	26,4	3,3
PB60b	12,4	3,3	12,9	3,3
PV23aPB60c	13,8	3,3	14,5	0,0
PV23b	21,1	3,3	19,3	3,3
PB15cPG7d_1	16,1	10,0	16,1	6,7
Modele wielowymiarowe naiwne				
(PB15cPG7d_1), (PB15dPG7fPV23c)	8,1	6,7	7,6	6,7
Modele dwuwymiarowe				
(PB60b, PV23aPB60c)	8,7	3,3	9,0	3,3
(PB60b, PB15dPG7fPV23c)	4,4	3,3	4,8	6,7
(PV23aPB60c, PB15dPG7fPV23c)	4,1	6,7	3,7	6,7

a) widma zrekonstruowane z wykorzystaniem funkcji sklepanej,

b) widma zrekonstruowane z wykorzystaniem funkcji liniowej,

c) informacja o zakresie spektralnym przypisana danej zmiennej znajduje się w tabeli 3.

8.2.2.3.2 Wyniki uzyskane dla modeli LR-DWT

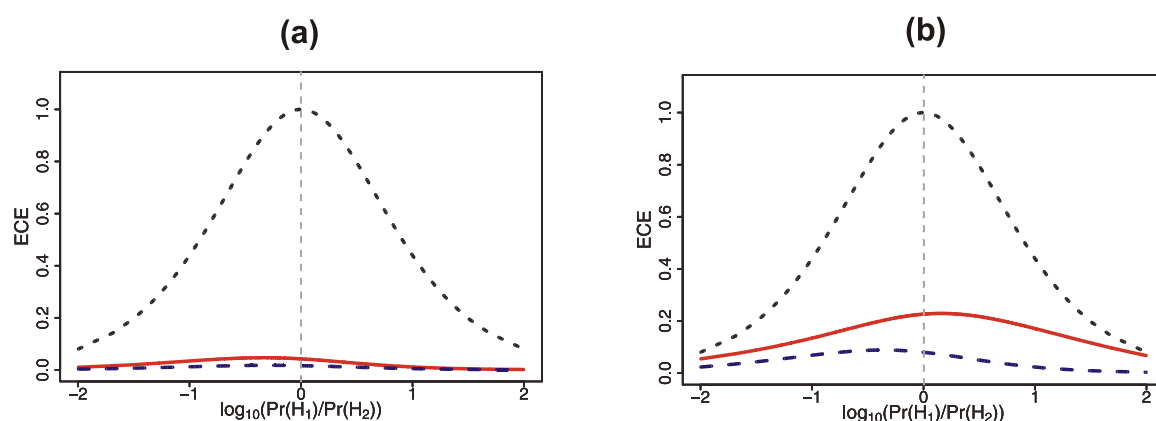
Najlepsze wyniki dla grupy niebieskich lakierów samochodowych typu niemetalik (Martyna i in. 2015) z wykorzystaniem modeli jednowymiarowych uzyskano dla dwóch zmiennych V3_73 oraz W3_82 (tabela 4), dla których procent odpowiedzi fałszywie pozytywnych i negatywnych nie przekraczał 10% (tabela 6). Wykresy Empirycznej Entropii Krzyżowej (punkt 4.3.) potwierdziły poprawność działania tych modeli dostarczając dowodu iż tylko 34% informacji (wartość $C_{llr,exp}$; definicje $C_{llr,exp}$ zilustrowano na rys. 4) dla zmiennej V_73, bądź 30% informacji (W3_82) nie jest wytłumaczonych przez te modele. Uzyskane wyniki potwierdziły również, iż w przypadku tych zmiennych sposób zastosowanej rekonstrukcji widm (funkcja liniowa, czy funkcja sklejana) nie miały znaczącego wpływu zarówno na poziom odpowiedzi błędnych, jak i stopień utraty informacji (wartości $C_{llr,exp}$ oraz przebieg wykresów ECE).

W przypadku lakierów typu metalik i modeli opartych na pojedynczej zmiennej nie obserwowano wyższego poziomu odpowiedzi błędnych, czy gorszego dopasowania krzywych ECE , jak to miało miejsce dla tej grupy próbek w przypadku jednowymiarowych modeli opartych o zmienne będące polem powierzchni pod wybranymi pasmami. Najlepsze wyniki przy zastosowaniu modeli jednowymiarowych uzyskano dla zmiennych V3_68 i W3_71, tj. procent odpowiedzi fałszywie pozytywnych i negatywnych nie przekraczał 10,1% (tabela 6). Wyniki ECE potwierdziły poprawność działania obu modeli. Niemniej jednak, najmniejszy stopień utraty informacji obserwowano dla zmiennej W3_71 ($C_{llr,exp} = 28,6\%$ dla widm poddanych rekonstrukcji liniowej i 26,2% dla widm zrekonstruowanych przy wykorzystaniu funkcji sklepanej).

Zastosowanie modeli wielowymiarowych w ocenie wartości dowodowej lakierów zarówno typu niemetalik, jak i metalik, na podstawie ich widm Ramana wpłynęło znacząco na zmniejszenie poziomu odpowiedzi fałszywie pozytywnych. Liczba odpowiedzi fałszywie negatywnych została zredukowana do zera dla grupy lakierów typu niemetalik i widm poddanych rekonstrukcji liniowej. Dla widm zarejestrowanych dla tych lakierów, zrekonstruowanych za pomocą funkcji sklepanej, jak również dla lakierów typu metalik bez względu na rodzaj rekonstrukcji widm, poziom odpowiedzi fałszywie negatywnych pozostał bez zmian (tabela 6). Wartości $C_{llr,exp}$ oraz przebieg wykresów ECE uzyskany dla modeli wielowymiarowych nie zawsze wykazywały też lepsze dopasowanie w stosunku do modeli jednowymiarowych, podobnie, jak to miało miejsce w przypadku modeli wielowymiarowych konstruowanych w oparciu o zmienne będące polem powierzchni pod wybranymi pasmami. Biorąc pod uwagę poziom odpowiedzi błędnych, jak i wyniki ECE , w przypadku lakierów typu niemetalik oba testowane modele wielowymiarowe oparte o zmienne dostarczające informacji o różnych pigmentach, tj. PG7, PB15 i PV23, zmniejszyły poziom odpowiedzi fałszywie pozytywnych do 0,7 % (tabela 6) i silnie wspierały poprawne hipotezy (rys. 9a). W przypadku lakierów typu metalik poprawność działania, wg oceny jakościowej (poziom odpowiedzi

błędnych; tabela 6), jak i ilościowej (wykresy *ECE*; rys. 9b), wykazał model oparty o zmienne W2_67 (informacja o pigmentcie PB 15) i silnie skorelowane zmienne W3_71 i V3_69 (informacje o pigmentcie PB 60) w formie $LR = LR(W2_67) \cdot LR(V3_69, W3_71)$. Drugi z testowanych modeli wielowymiarowych, tj. $LR = LR(W3_71, W3_72, W3_73) \cdot LR(W2_67) \cdot LR(V3_30)$, w którym zawarto informacje o wszystkich możliwych pigmentach identyfikowanych w grupie niebieskich lakierów samochodowych typu metalik, tj. PG 7, PB 15, PV 23 oraz PB 60, znacząco zmniejszyła poziom odpowiedzi błędnych ($Fp = 1,6\%$ i $Fn = 6,7\%$ bez względu na rodzaj zastosowanej rekonstrukcji widm). Niemniej jednak model ten bardzo mocno wspierał niepoprawne hipotezy ($C_{llr,exp}$ ponad 100% bez względu na rodzaj zastosowanej procedury rekonstrukcji widm).

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono również, iż generalnie sposób rekonstrukcji widm nie wpływa znacząco na interpretację dowodu przy wykorzystaniu testów ilorazu wiarygodności. Wpływ ten zaobserwowano jedynie dla trzech zmiennych z bazy lakierów typu niemetalik, tj. V3_46, V3_66 oraz V3_68 (tabela 4), dla których gorszy przebieg wykresów *ECE* dla wybranego sposobu rekonstrukcji podyktowany był silnym wsparciem błędnej hipotezy dla pojedynczego porównania (Martyna i in. 2015).



Rys. 9. Wykres Empirycznej Entropii Krzyżowej (*ECE*) dla: (a) modelu wielowymiarowego $LR = LR(V3_33, V3_73, W2_67) \cdot LR(V3_77)$ opracowanego dla bazy danych lakierów typu niemetalik, (b) modelu wielowymiarowego $LR = LR(W2_67) \cdot LR(V3_69, W3_71)$ opracowanego dla bazy danych lakierów typu metalik. Linia czerwona – wykres *ECE* uzyskany dla eksperymentalnych wartości *LR*, linia czarna – wykres *ECE* uzyskany przy założeniu $LR=1$, linia niebieska – wykres *ECE* uzyskany dla eksperymentalnych wartości *LR* dodatkowo skalibrowanych z wykorzystaniem algorytmu *PAV* (szczegóły w pkt. 4.2.2). Rysunki pochodzą z publikacji Martyna i in. (2015) – (a) to rys. 6a; (b) to rys. 6e.

Tabela 6. Poziom odpowiedzi fałszywie pozytywnych (Fp) i fałszywie negatywnych (F_n) dostarczanych przez testowane modele LR -DWT.

Zmienne	Funkcja sklejana ^{a)}		Interpolacja liniowa ^{b)}	
	Fp [%]	F _n [%]	Fp[%]	F _n [%]
Lakiery typu niemetalik				
Modele jednowymiarowe				
V3_30 ^{c)}	17,9	3,3	17,7	3,3
V3_33	16,3	0,0	15,6	3,3
V3_46	20,9	3,3	21,8	3,3
V3_66	14,9	3,3	15,9	3,3
V3_68	20,9	6,7	31,5	3,3
V3_73	9,7	6,7	9,9	6,7
V3_77	16,8	0,0	17,0	0,0
W3_18	10,1	3,3	12,0	6,7
W3_30	12,9	3,3	13,8	3,3
W3_33	31,0	3,3	31,0	3,3
W3_66	48,3	3,3	48,3	3,3
W3_77	11,5	3,3	12,6	3,3
W3_82	9,2	3,3	9,4	3,3
W2_67	16,1	0,0	16,3	3,3
Modele wielowymiarowe				
(V3_33,V3_73,W2_67),(V3_77)	0,7	3,3	0,7	0,0
(V3_30),(W3_18),(W3_82)	0,7	3,3	0,7	0,0
Lakiery typu metalik				
Modele jednowymiarowe				
V3_30	10,6	3,3	10,8	3,3
V3_66	12,9	3,3	12,9	3,3
V3_68	9,4	6,7	9,7	6,7
V3_69	13,1	6,7	13,1	6,7
V3_70	11,7	3,3	12,0	3,3
W3_33	43,7	6,7	42,3	6,7
W3_71	10,1	3,3	10,1	3,3
W3_72	13,8	3,3	14,0	3,3
W3_73	15,9	3,3	15,6	3,3
W2_67	16,8	3,3	15,4	6,7
Modele wielowymiarowe				
(W2_67),(V3_69,W3_71)	2,1	3,3	2,3	3,3
(W3_71,W3_72,W3_73),(W2_67),(V3_30)	1,6	6,7	1,6	6,7

a) widma zrekonstruowane z wykorzystaniem funkcji sklepanej,

b) widma zrekonstruowane z wykorzystaniem funkcji liniowej,

c) informacja o zakresie spektralnym przypisanym danej zmiennej znajduje się w tabeli 4.

8.2.2.3.3 Wyniki uzyskane dla modeli hybrydowych LR-DR-LDA

Na podstawie Bayesowskiego kryterium informacji (*BIC*) ustalono, iż w rozwiązaniu problemu porównawczego widm Ramana zasadnym będzie wykorzystanie jedno-, dwu- i trójwymiarowych naiwnych modeli *LR* (Martyna i in. 2016). Bez względu na rodzaj analizowanych próbek (lakiery typu niemetalik i metalik rozpatrywanie oddzielnie), czy rodzaj wykorzystanej miary odległości (Manhattan, Euklidesa, kwadrat odległości Euklidesa, Czebyszewa, czy opartej na współczynniku korelacji Pearsona), zwiększenie liczby zmiennych wykorzystywanych przez modele *LR* skutkowało obniżeniem poziomu odpowiedzi fałszywie pozytywnych z około 16% dla modeli jednowymiarowych do mniej niż 5% dla modeli trójwymiarowych. Nie wpływało natomiast na poziom odpowiedzi fałszywie negatywnych, który dla wszystkich testowanych modeli utrzymywał się na stałym poziomie 10% (tabela 7; rys. 7b i 7c w Martyna i in. (2016)).

Wyniki Empirycznej Entropii Krzyżowej (Tabela 8) potwierdziły poprawność działania wszystkich modeli, wskazując, iż wsparcie dla niepoprawnych odpowiedzi jest niewielkie.

Tabela 7. Poziom odpowiedzi fałszywie pozytywnych (*Fp*) i fałszywie negatywnych (*Fn*) dostarczanych przed naiwne, hybrydowe modele *LR-DR-LDA*.

Reprezentacja wzajemnego podobieństwa próbek	Modele <i>LR</i>					
	jednowymiarowe		dwuwymiarowe		trójwymiarowe	
	<i>Fp</i> [%]	<i>Fn</i> [%]	<i>Fp</i> [%]	<i>Fn</i> [%]	<i>Fp</i> [%]	<i>Fn</i> [%]
Lakiery typu niemetalik						
Manhattan	11,1 ^{a)}	10,0	2,22	10,0	0,00	10,0
Euklidesa	13,3	10,0	2,22	10,0	0,00	10,0
kwadrat odległości Euklidesa	10,0	10,0	2,22	10,0	0,00	10,0
Czebyszewa	15,6	10,0	4,44	10,0	2,22	10,0
oparta na współczynniku korelacji	11,1	10,0	2,22	10,0	0,00	10,0
Lakiery typu metalik						
Manhattan	13,3	10,0	4,44	10,0	2,22	10,0
Euklidesa	13,3	10,0	4,44	10,0	2,22	10,0
kwadrat odległości Euklidesa	11,1	10,0	2,22	10,0	0,00	10,0
Czebyszewa	15,6	10,0	6,67	10,0	4,44	10,0
oparta na współczynniku korelacji	11,1	10,0	2,22	10,0	2,22	10,0

a) mediana z wartości *LR* uzyskana dla 100 wygenerowanych zbiorów testowych.

Tabela 8. Wyniki Empirycznej Entropii Krzyżowej ($C_{llr,exp}$, $C_{llr,cal}$) dostarczane przez naiwne, hybrydowe modele *LR-DR-LDA*. Tabela 1 z publikacji **Martyna i in. (2016)**.

Reprezentacja wzajemnego podobieństwa próbek	Modele <i>LR</i>					
	jednowymiarowe		dwuwymiarowe		trójwymiarowe	
	$C_{llr,exp}$ [%]	$C_{llr,cal}$ [%]	$C_{llr,exp}$ [%]	$C_{llr,cal}$ [%]	$C_{llr,exp}$ [%]	$C_{llr,cal}$ [%]
Lakiery typu niemetalik						
Manhattan	5,8 ^{a)}	0,0	0,7	0,0	0,1	0,0
Euklidesa	5,9	0,0	0,7	0,0	0,09	0,0
kwadrat odległości Euklidesa	4,7	0,0	0,4	0,0	0,05	0,0
Czebyszewa	4,9	0,0	0,5	0,0	0,05	0,0
oparta na współczynniku korelacji	8,4	0,0	1,4	0,0	0,05	0,0
Lakiery typu metalik						
Manhattan	6,7	0,0	1,1	0,0	0,02	0,0
Euklidesa	5,9	0,0	0,8	0,0	0,1	0,0
kwadrat odległości Euklidesa	5,6	0,0	0,6	0,0	0,1	0,0
Czebyszewa	5,6	0,0	0,7	0,0	0,1	0,0
oparta na współczynniku korelacji	7,6	0,0	1,4	0,0	0,3	0,0

a) mediana z wartości C_{llr} uzyskana dla 100 wygenerowanych zbiorów testowych.

8.2.2.4 Klasyczna interpretacja danych vs. modele *LR*

Wyniki uzyskane z testów ilorazu wiarygodności opartych na zmiennych będących polami powierzchni pod wybranymi pasmami (modele *LR-BA*) porównano z wynikami analizy wizualnej (rys. A1 i A2 w Załączniku A; **Michalska i in. 2015**). Stwierdzono, że w przypadku grupy lakierów typu niemetalik poziom odpowiedzi fałszywie pozytywnych w przypadku modeli jednowymiarowych (7 z 10 testowanych modeli), jak i modeli dwuwymiarowych, zarówno naiwnego, jak i tych opartych o wysoce skorelowane zmienne był zdecydowanie niższy niż w przypadku wizualnego porównania widm ($Fp = 17,7\%$). W przypadku lakierów typu metalik poziom odpowiedzi fałszywie pozytywnych dla wszystkich modeli jednowymiarowych był wyższy niż wyniki uzyskane z wykorzystaniem wizualnego porównania widm ($Fp = 8,5\%$). Niemniej jednak, zastosowanie dwuwymiarowego modelu naiwnego, bądź modeli dwuwymiarowych opartych o wysoce skorelowane zmienne, pozwoliło uzyskać porównywalny, bądź niższy poziom odpowiedzi fałszywie pozytywnych dla tych lakierów. Ponadto, modele *LR* pozwoliły uwzględnić informacje wynikające z niejednorodności próbki, w tym określić procent odpowiedzi fałszywie negatywnych, co nie było możliwe do ustalenia na podstawie wizualnego porównania widm.

Analizując dokładnie uzyskane wyniki ustalono, iż większość próbek lakierów, dla których widma Ramana nie były rozróżnialne wizualnie (zarówno w grupie lakierów metalik, jak i niemetalik) było możliwych do rozróżnienia przynajmniej z wykorzystaniem jednego z zaproponowanych modeli *LR-BA*. Nie zaobserwowano również przypadku, by widma, które wykazywały wizualne różnice nie były możliwe do rozróżnienia z zastosowaniem tego podejścia.

Stąd biorąc pod uwagę obiektywizm, szybkość, jak również możliwość uwzględnienia możliwych źródeł błędów, w tym zmienności wewnątrzobiektywnej, podejście ilorazu wiarygodności powinno zastąpić wciąż praktykowane wizualne porównywanie widm.

8.3 Ocena wpływu powiększenia obiektywu na interpretację widm Ramana

Wykorzystanie metod statystycznych bądź chemometrycznych w analizie porównawczej próbek wymaga zidentyfikowania parametrów metody analitycznej, które mogą mieć istotny wpływ na zmienność uzyskiwanych pomiarów. W przypadku identyfikacji takich czynników prowadzi się proces optymalizacji, polegający na wyborze takich parametrów metody, które zapewnią maksymalną zmienność pomiędzy pomiarami wykonywanymi dla różnych próbek, tj. zmienność międzyobiektywą, i jednocześnie pozwolą zminimalizować zmienność pomiędzy pomiarami uzyskiwanymi w obrębie danej próbki, tj. zmienność wewnątrzobiektywą. Ustalenie takich warunków pomiarowych zapewnia, iż dane opisujące konkretną próbkę są zdecydowanie bardziej „podobne” względem siebie, niż dane opisujące różne próbki. W konsekwencji prowadzi to do zmniejszenia prawdopodobieństwa uzyskania odpowiedzi fałszywie pozytywnych, jak i fałszywie negatywnych, dostarczanych przez metody obliczeniowe, w tym testy *LR* stosowane do rozwiązania problemu porównawczego (rozdział 4).

W przypadku metody spektroskopii Ramana parametrem, który może mieć istotny wpływ na zmienność uzyskiwanych widm jest powiększenie obiektywu, przez który wiązka laserowa ogniskowana jest na powierzchni próbki podczas wykonywania pomiarów. Powiększenie obiektywu, a dokładniej jego apertura numeryczna (*N.A.*) determinuje rozmiar wiązki lasera oddziałującej z próbką, tzw. *laser spot size* ($d_{x,y}$), który zgodnie z podwójnym kryterium Rayleigh’a równy jest $\frac{1,22 \cdot \lambda}{N.A.}$ (gdzie λ oznacza długość linii wzbudzającej), jak również wpływa na odległość, na jaką laser wnika w głąb próbki, tzw. *depth of field* d_z (zgodnie z równaniem $d_z = \frac{4 \cdot n \cdot \lambda}{(N.A.)^2}$, gdzie n stanowi współczynnik załamania światła analizowanej próbki). Parametr ten może mieć więc istotny wpływ zarówno na zmienność wewnątrzobiektywą niehomogenicznych próbek, do których należą niebieskie lakiery samochodowe, jak również na powtarzalność uzyskiwanych pomiarów.

Dotychczas na przykładzie próbek lakierowych parametr ten oceniono dwukrotnie. W pierwszej z prac (Lambert i in. 2014) autorzy testowali wpływ powiększenia obiektywu na

zmiennosc, a w drugiej na jakosc (Ferreira i in. 2017) uzyskiwanych widm. W zadenym z prezentowanych badan parametr ten nie byl jednak oceniany na przykladzie analizy lakierow tego samego koloru, ktory wynikałby z obecności tych samych pigmentów. Lambert oceniał wpływ powiększenia obiektywu na podstawie wyników uzyskanych dla dwóch lakierów typu niemetalik różniących się dodatkowo kolorem, tj. jednego czerwonego i jednego zielonego. Grupa Ferreiry przeprowadziła badania 36 próbek lakierów samochodowych różnej barwy, niemniej jednak wpływ powiększenia obiektywu na jakość uzyskiwanych widm przedstawiono na przykładzie analizy widm ramanowskich uzyskanych tylko dla jednej próbki barwy białej (lakier typu niemetalik). Ponadto, w obu tych pracach parametr ten był testowany (Lambert i inni 2014), bądź prezentowany (Ferreira 2017) tylko na przykładzie widm Ramana uzyskanych przy wykorzystaniu jako źródła wzbudzania lasera z zakresu światła podczerwonego (785 nm).

W odróżnieniu od innych, Autorka (**Michalska i in. 2017**) oceniła wpływ powiększenia obiektywu dla dwóch źródeł wzbudzania próbek, tj. lasera argonowego o długości linii wzbudzającej 514,5 nm oraz lasera podczerwonego o długości linii wzbudzającej 785 nm. Badania przeprowadzone zostały na grupie lakierów samochodowych tej samej barwy zarówno typu metalik, jak i niemetalik (wykaz próbek wykorzystanych w badaniach przedstawiono w tabelach A1 i A2; załącznik A; *Eksperyment 5*), których widma ramanowskie uzyskane przy użyciu danego lasera charakteryzowały się obecnością tych samych pasm pochodzących od pigmentów tj. *dioxazine violet* (PV 23) oraz ftalocyjaniny miedzi (PB 15). W pracy oceniano wpływ powiększenia obiektywu na zmienność uzyskiwanych widm (rozdział 8.3.1) oraz sprawdzono, czy stosowanie różnych powiększeń obiektywu do ogniskowania się na powierzchni próbki dowodowej i porównawczej może wpłynąć na wnioskowanie w obrębie problemu porównawczego rozwiązywanego z wykorzystaniem podejścia ilorazu wiarygodności (rozdział 8.3.2). Wpływ parametrów metody analitycznej na uzyskiwane wartości LR nie był dotychczas testowany.

8.3.1 Wpływ powiększenia obiektywu na zmienność widm Ramana

Ocenę wpływu powiększenia obiektywu na zmienność widm Ramana rejestrowanych dla danej grupy próbek (lakiery typu metalik i niemetalik analizowane oddzielnie) w zależności od zastosowanego źródła wzbudzania (514,5 nm lub 785 nm) przeprowadzono z wykorzystaniem testu F, stosując jako zmienne pole powierzchni pod wybranymi pasmami pochodzącymi od pigmentów (zakresy pasm podano w tabeli 9). Decyzję, czy powiększenie to wpływa istotnie na zmienność widm, a jeśli tak, to który z testowanych obiektywów tj. 20× (N.A.=0,4), 50× (N.A.=0,75), 100× (N.A.=0,85) powinien być stosowany do ogniskowania się na powierzchni próbek podczas pomiarów ramanowskich, podjęto na podstawie analizy danych dotyczących zmienności wewnątrzobiektywowej, międzyobiektywowej oraz wartości czynnika F (tabela 9). Szczegóły eksperymentów zamieszczono w **Michalska i in. (2017)**.

Biorąc pod uwagę wszystkie analizowane parametry ustalono, iż powiększenie obiektywu, wpływa istotnie na zmienność widm niezależnie od typu badanych lakierów, czy zastosowanego źródła wzbudzenia próbek (tabela 9). W przypadku lakierów typu niemetalik największe wartości zmienności międzyobiektywnej, jak również najwyższe wartości czynnika F obserwowano dla widm zarejestrowanych przy wykorzystaniu pięćdziesięciokrotnie powiększającego obiektywu. W przypadku lakierów typu metalik wyniki nie były już tak jednoznaczne, co może być podyktowane obecnością w tego typu próbkach płatków miki, bądź aluminium, które mogą stanowić dodatkowe źródło zmienności. Niemniej jednak, dla większości zmiennych (tabela 9) wyniki uzyskane dla widm uzyskanych przy wykorzystaniu obiektywu $50\times$ były lepsze, bądź przynajmniej porównywalne, z tymi uzyskanymi, gdy na próbkach ogniskowano się stosując $20\times$ lub $100\times$ powiększający obiektyw. Stąd uznano, iż podczas pomiarów ramanowskich lakierów należy wykorzystywać $50\times$ powiększający obiektyw ($N.A.=0,75$).

Wyniki uzyskane przez autorkę są zgodne z ustaleniami Ferreiry (Ferreira i in. 2017), który wybrał to powiększenie obiektywu analizując jedynie jakość widm ocenianą na podstawie analizy stosunku sygnału do szumu. Natomiast pozostają w sprzeczności z wnioskami Lamberta (Lambert i in. 2014), który na podstawie analizy wyników uzyskanych dla dwóch próbek różnej barwy nie zaobserwował wpływu powiększenia obiektywu (dwa z trzech testowanych przez autorkę powiększeń tj. $20\times$ i $50\times$) na zmienność widm.

Tabela 9. Wyniki dotyczące wpływu powiększenia obiektywu na zmienność widm lakierów typu metalik i niemetalik ocenianych dla dwóch źródeł wzbudzania próbek, tj. 514,5 nm i 785 nm. Tabela 3 w publikacji Michalska i in. (2017).

Zmienna	Zakres spektralny [cm ⁻¹]	Powiększenie obiektywu								
		20× (N.A. ^a = 0,4)			50× (N.A. = 0,75)			100× (N.A. = 0,85)		
		W ^{b)}	M ^{c)}	F ^{d)}	W	M	F	W	M	F
Lakiery typu niemetalik										
514,5 nm										
PV23_1	570 – 600	25	683	27	48	4399	92	233	694	3
PV23_2	600 – 635	36	441	12	45	3410	76	275	594	2
PV23_PB15_3	660 – 690	55	689	13	46	4395	96	66	347	2
PV23_4	1320 – 1368	304	6417	21	965	29854	31	1851	9087	5
PV23_5	1368 – 1412	126	8135	65	3992	108632	27	9214	24037	3
PV23_PB15_6	1415 – 1465	78	1106	14	1068	7398	7	1543	5745	4
PB15_7	1515 – 1550	178	7280	41	377	63175	168	1062	14415	14
785 nm										
PB15_1	674 – 688	83	11767	142	15	63846	4406	214	20959	98
PB15_2	738 – 760	126	64776	514	29	340762	11896	417	51353	123
PV23_3	1370 – 1410	4783	55560	12	823	270818	335	2251	51663	22
PV23_PB15_4	1420 – 1460	448	5255	12	78	20551	257	365	483	9
PB15_5	1510 – 1560	718	209608	292	150	997956	6647	945	142850	151
Lakiery typu metalik										
514,5 nm										
PV23_1	570 – 600	904	4524	5	650	15544	24	687	28	0,03
PV23_2	600 – 635	1012	4369	4	594	7730	13	500	111	0,20
PV23_PB15_3	660 – 690	3021	2498	0,83	1059	5899	6	1168	814	0,70
PV23_4	1320 – 1368	34582	0,19	0,00	9134	20279	2	8599	115960	13
PV23_5	1368 – 1412	1044	2506	2	1735	1880	1	2680	3070	1
PV23_PB15_6	1415 – 1465	800	2600	3	1839	428978	233	28319	1781878	63
PB15_7	1515 – 1550	92629	1538	0,02	25528	24675	1	26882	22011	0,82
785 nm										
PB15_1	674 – 688	606	5216	9	426	2012	5	1752	3464	2
PB15_2	738 – 760	1032	708	0,69	2082	2525	1	3708	20	0,01
PV23_3	1370 – 1410	3176	253685	80	4432	883858	199	2000	188579	94
PV23_PB15_4	1420 – 1460	4608	3520	0,76	2884	1892	0,66	37068	116352	3,14
PB15_5	1510 – 1560	14035	121501	9	28950	404449	14	34746	76599	2

a) N.A. – apertura numeryczna obiektywu, przez który ogniskowano się na powierzchni lakieru podczas pomiarów ramanowskich,

b) W – zmienność wewnątrzobiektywa,

c) M – zmienność międzyobiektywa,

d) F – czynnik F, którego wartość wyznaczono jako stosunek M do W.

8.3.2 Wpływ powiększenia obiektywu na rozwiązanie problemu porównawczego z wykorzystaniem podejścia ilorazu wiarygodności

W tej części eksperymentów oceniano, czy stosowanie różnych powiększeń obiektywu do ogniskowania się na powierzchni próbki dowodowej i porównawczej podczas pomiarów ramanowskich może wpłynąć na błędne wnioskowanie w obrębie problemu porównawczego rozwiązywanego z wykorzystaniem podejścia ilorazu wiarygodności. W tym celu porównywano widma zarejestrowane dla konkretnej próbki lakierowej, w ten sposób, iż widma uzyskane przy jednym powiększeniu, np. 20 \times symulowały lakier porównawczy, a te uzyskane przy innym powiększeniu, np. 50 \times , symulowały lakier dowodowy. Założono, że w przypadku braku wpływu testowanego parametru, modele *LR* będą dostarczały jedynie prawidłowych odpowiedzi (tj. $LR > 1$ wspierające hipotezę iż porównywane widma pochodzą z tej samej próbki), w przeciwnym razie, odpowiedzi fałszywie negatywne ($LR < 1$ wspierające hipotezę, iż porównywane widma dotyczą różnych próbek) będą występowały. Do oceny wpływu testowanego parametru wykorzystano dwa typy modeli *LR*, tj. te bazujące na zmiennych będących polem powierzchni pod wybranymi pasmami (*modele LR-BA*) oraz te oparte o zmienne wyselekcjonowane w wyniku zastosowania dyskretnej transformacji falkowej (*modele LR – DWT*). Dla widm uzyskanych z użyciem lasera podczerwonego (785 nm) wykorzystano uprzednio opracowane modele (tabela 10). Szczegóły dotyczące ich tworzenia i walidacji dla dobrej jakości widm (785nm) w zależności od typu użytych zmiennych można znaleźć w **Michalska i in. (2015)** lub w **Martyna i in. (2015)**. Aby móc ocenić wpływ powiększenia obiektywu dla lakierów opisanych przez widma uzyskane przy zastosowaniu lasera argonowego (514,5 nm) w pierwszej kolejności opracowano modele *LR* dla baz danych złożonych z dobrej jakości widm uzyskanych przy wykorzystaniu tego lasera (wykaz próbek użytych w eksperymencie zawarto w tabeli A1 i A2; załącznik A; *Eksperyment 7*), a następnie zastosowano je do oceny wpływu testowanego parametru. Szczegóły dotyczące konstrukcji tych modeli dla baz danych (514,5 nm) oraz opis eksperymentów dotyczących analizy wpływu powiększenia obiektywu na wnioskowanie w obrębie problemu porównawczego zamieszczono w **Michalska i in. (2017)**.

Informacje dotyczące wykorzystanych modeli *LR* (poziom odpowiedzi błędnych, wyniki *ECE* dla baz danych) zamieszczono w tabeli 10, natomiast wyniki dotyczące wpływu powiększenia obiektywu na rozwiązanie problemu porównawczego w zależności od grupy testowanych lakierów odpowiednio w tabelach 11 i 12.

Tabela 10. Poziom odpowiedzi fałszywie pozytywnych (Fp), fałszywie negatywnych (Fn) oraz wyniki Empirycznej Entropii Krzyżowej ($C_{llr,exp}$, $C_{llr,cal}$) dostarczane przed modele $LR-BA$ i $LR-DWT$ opracowane dla bazy danych lakierów typu metalik i niemetalik złożonych z dobrej jakości widm, a wykorzystane następnie w ocenie wpływu powiększenia obiektywu na rozwiązanie problemu porównawczego. Wykaz próbek, których widma wykorzystano do opracowania poszczególnych modeli LR można znaleźć w załączniku A (tabela A1; Eksperymenty 2, 3 oraz 7).

Rodzaj lasera	Modele LR	Zakres spektralny [cm^{-1}]	Fp [%]	Fn [%]	$C_{llr,exp}$ [%]	$C_{llr,cal}$ [%]
Lakiery typu niemetalik						
514,5 nm	LR(PV23_7, PB15_10)	1368 – 1412, 1515 – 1550	9,0	11,1	58,3	22,1
	LR(V_31,W_97)	612 – 624, 1514 – 1526	11,8	0,0	23,1	18,2
785 nm	LR(PB15cPG7d_2,PG7aPB15a)	725 – 765, 1490 – 1565	3,3	8,0	21,7	9,6
	LR(V3_30) · LR(W3_82) · LR(W3_18)	481 – 495, 678 – 692, 1531 – 1545	0,7	0,0	5,7	2,4
Lakiery typu metalik						
514,5 nm	LR(PV23_PB60_7, PB15_10)	1368 – 1412, 1515 – 1550	14,0	11,8	38,5	22,1
	LR(W3_85, W3_98)	1350 – 1362, 1528 – 1540	9,6	11,8	64,8	52,0
785 nm	LR(PV23aPB60c, PB15dPG7fPV23c)	1333 – 1350, 1370 – 1415	3,7	6,7	24,5	14,9
	LR(W3_71,W3_72,W3_73) · LR(W2_67) · LR(V3_30)	678 – 692, 743 – 750, 1350 – 1366, 1367 – 1382, 1383 – 1398,	1,6	6,7	129,2	9,4

Tabela 11. Wartości ilorazu wiarygodności uzyskane w eksperymentach badających wpływ powiększenia obiektu na rozwiązanie problemu porównawczego w przypadku analizy lakierów typu niemetalik z wykorzystaniem jako źródła wzbudzenia laserów 514,5 i 785 nm. Tabela 4 w publikacji Michalska i in. (2017).

Rodzaj lasera	Lakier nr 6			Lakier nr 9			Lakier nr 25			Lakier nr 26			Lakier nr 31		
	20× ^{a)}	50×	100×	20×	50×	100×	20×	50×	100×	20×	50×	100×	20×	50×	100×
514,5 nm	20×	171		123			170			599			5		
	50×	55	50	0,3	128		300	158		557	560		8	15	
	100×	3·10 ⁻⁵	8·10 ⁻⁷	18	56	2·10 ⁻⁴	67	199	3	14	8	407	33	0,01	1,4
	LR(PV23_7, PB 15_10)														
514,5 nm	20×	50×	100×	20×	50×	100×	20×	50×	100×	20×	50×	100×	20×	50×	100×
	20×	42		57			70			64			49		
	50×	105	9	11	62		46	8		2	58		77	48	
	100×	1·10 ⁻³	0,01	65	81	60	16	78	5	1·10 ⁻³	21	69	0,8	11	24
	LR(V3_31, W3_97)														
785 nm	20×	50×	100×	20×	50×	100×	20×	50×	100×	20×	50×	100×	20×	50×	100×
	20×	43		50			10			1·10 ⁶			1,1		
	50×	64	4	4	13		16	29		1·10 ⁶	1·10 ⁸		1,2	1,2	
	100×	2·10 ⁻¹⁰	6·10 ⁻⁸	77	5·10 ⁻⁵	2·10 ⁻¹²	7	6·10 ⁻⁷	5·10 ⁻¹³	6·10 ⁻⁵	3·10 ⁸	1·10 ⁸	1,3	1,3	3·10 ⁻⁴
	LR(PB15cPG7d_2, PG7aPB15a)														
785 nm	20×	50×	100×	20×	50×	100×	20×	50×	100×	20×	50×	100×	20×	50×	100×
	20×	0,9		1,5			1			1,1			1,3		
	50×	1,4	1,2	0,09	1,5		1,4	1,2		1,2	1,2		1,5	1,1	
	100×	1,3	1,3	0,3	1,4	1,2	1,2	1,3	1	1,3	1,3	3·10 ⁻⁴	1,5	1,4	0,8
	LR(V3_30)·LR(W3_82)·LR(W3_18)														

a) powiększenie obiektu wykorzystywane do ogniskowania się na powierzchni lakieru podczas pomiarów ramanowskich - 20× (N.A. = 0,4), 50× (N.A. = 0,75), 100× (N.A. = 0,85); b) informacje dotyczące lakierów można znaleźć w tabeli A1, załącznik A; Eksperyment 5; c) wartość LR dostarczana przez dany model LR; LR > 1 spodziewana odpowiedź sugerująca brak wpływu testowanego parametru na wnioskowanie w obrębie problemu porównawczego. Szczegóły w opracowaniu.

Tabela 12. Wartości ilorazu wiarygodności uzyskane w eksperymentach badających wpływ powiększenia obiektywu na rozwiązanie problemu porównawczego w przypadku analizy lakierów typu metalik z wykorzystaniem jako źródła wzbudzenia laserów 514,5 i 785 nm. Tabela 5 w publikacji Michalska i in. (2017).

Rodzaj lasera	Lakier nr 23 ^{b)}			Lakier nr 26			Lakier nr 34			Lakier nr 36			Lakier nr 40		
514,5 nm	LR(PV23_PB60_7, PB_10)														
	20× ^{a)}	50×	100×	20×	50×	100×	20×	50×	100×	20×	50×	100×	20×	50×	100×
	20×	13 ^{c)}		13			13			14			13		
	50×	22	14	0,1	3		24	13		22	13		9	4	
	100×	21	26	10	5·10 ⁻³	19	7	23	26	14	24	20	5	7	30
	LR(W3_85, W3_98)														
	20×	50×	100×	20×	50×	100×	20×	50×	100×	20×	50×	100×	20×	50×	100×
	30			8			26			26			24		
	50×	35	15	4·10 ⁻⁶	0,1		5	22		0,3	6		27	20	
	100×	56	49	5	4·10 ⁻⁹	56	26	9	43	25	0,7	17	3	1,4	13
785 nm	LR(PV23aPB60c, PB15dPG7fPV23c)														
	20×	50×	100×	20×	50×	100×	20×	50×	100×	20×	50×	100×	20×	50×	100×
	45			87			22			70			153		
	50×	41	48	3·10 ⁻⁴	26		17	54		49	37		109	181	
	100×	69	100	48	1·10 ⁻⁵	32	3	45	41	9	104	54	44	284	207
	LR(W3_71,W3_72,W3_73)·LR(W2_67)·LR(V3_30)														
	20×	50×	100×	20×	50×	100×	20×	50×	100×	20×	50×	100×	20×	50×	100×
	164			25			7			19			119		
	50×	3·10 ⁻⁴	51	1·10 ⁻⁴	17		10	17		5	5		41	41	
	100×	8·10 ⁻¹²	0,9	4,2	18	1·10 ⁻⁴	47	5	37	15	17	14	7	106	63

a) powiększenie obiektywu wykorzystywane do ogniskowania się na powierzchni lakieru podczas pomiarów ramanowskich - 20× (N.A. = 0,4), 50× (N.A. = 0,75), 100× (N.A. = 0,85); b) informacje dotyczące lakierów można znaleźć w tabeli A2, załącznik A; *Eksperyment 5*; c) wartość LR dostarczana przez dany model LR; LR > 1 spodziewana odpowiedź sugerująca brak wpływu testowanego parametru na wnioskowanie w obrębie problemu porównawczego. Szczegóły w opracowaniu.

Uzyskane wyniki wskazują, iż stosowanie różnych powiększeń obiektywu do ogniskowania się na próbce dowodowej i porównawczej może mieć istotny wpływ na wnioskowanie w obrębie problemu porównawczego bez względu na rodzaj analizowanych próbek (lakierzy typu metalik i niemetalik analizowane oddzielnie), rodzaj źródła wzbudzania (514,5 nm czy 785 nm), czy wreszcie typ modelu ilorazu wiarygodności wykorzystany do jego rozwiązania (tj. *LR-BA* czy *LR-DWT*). Zatem, to samo powiększenie obiektywu, tj. 50× (które ustalono w oparciu o wyniki testu F) powinno być stosowane do ogniskowania się na powierzchni próbki dowodowej i porównawczej podczas pomiarów ramanowskich.

8.4 Wstępne naświetlanie (*photobleaching*) jako metoda pozwalająca uzyskać informatywne widma Ramana

Jednym z podstawowych ograniczeń spektroskopii Ramana jest fluorescencja, której pojawienie się może całkowicie uniemożliwić przeprowadzenie badań identyfikacyjno-porównawczych. Spośród dostępnych technik redukcji fluorescencji (rys. 2 w rozdziale 3.2.1) podczas analizy lakierów samochodowych problem ten rozwiązywano dotychczas poprzez zastosowanie kilku źródeł wzbudzania próbek (Buzzini i Massonnet 2004, Zięba-Palus i in. 2011, Zięba-Palus i Wąs-Gubała 2011), bądź też wykorzystywano metodę spektroskopii Ramana z transformacją Fouriera (*FT-Raman*; Kuptsov 1994, Massonnet i Stoecklein 1999c). W przypadkach, gdy fluorescencja powodowała jedynie podniesienie linii bazowej proponowano „odcięcie tła” poprzez zastosowanie odpowiednich technik obliczeniowych (Palenik i in. 2004). Metoda wstępnego naświetlania została wykorzystana przez Buzzini i współautorów (Buzzini i in. 2006) do uzyskania informatywnych widm Ramana dla dwóch fluorescencyjnych próbek czerwonych lakierów samochodowych. Inni (Palenik i in. 2014) wspomnieli jedynie, iż zastosowanie metody *photobleaching* w przypadku próbek lakierów, dla których w standardowych pomiarach ramanowskich rejestrowano jedynie fluorescencję, pozwoliło na ujawnienie pasm pochodzących od pigmentów. Niemniej jednak, w pracy ww. autorów nie zamieszczono żadnych istotnych informacji dotyczących parametrów naświetlania, liczby próbek poddanych temu procesowi, czy liczby próbek, w których skutecznie wygaszono fluorescencję. W obu przypadkach (Buzzini i in. 2006, Palenik i in. 2014) proces naświetlania, jak i pomiary ramanowskie prowadzono stosując jako źródło wzbudzania laser z zakresu światła czerwonego (785 nm).

W badaniach prowadzonych przez Autorkę (Zięba-Palus, Michalska 2014b oraz Michalska i in. 2017) metoda wstępnego naświetlania została zastosowana do grupy 20 niebieskich lakierów samochodowych (10 typu metalik i 10 typu niemetalik; tabele A1 i A2; załącznik A; *Eksperyment 6*), których widma Ramana charakteryzowały się jedynie fluorescencją, bądź fluorescencja dominowała w ich widmach uniemożliwiając tym samym identyfikację pigmentów. W trakcie badań do naświetlania lakierów, jak i uzyskania widm Ramana, wykorzystywano laser z zakresu światła zielonego (514,5 nm). W pracy (Zięba-Palus

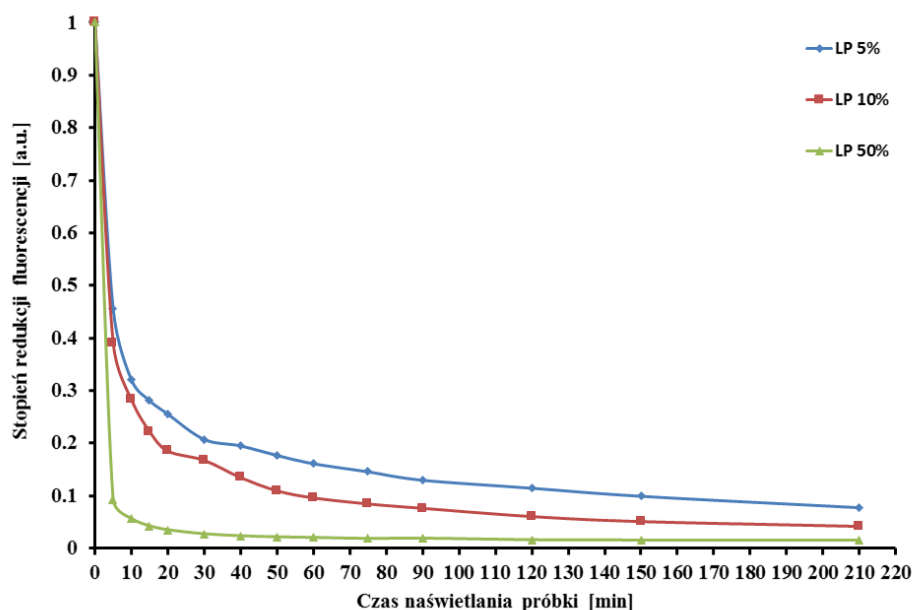
i Michalska 2014b) analizowano parametry metody wstępnego naświetlania, jak i efektywność metody w uzyskiwaniu informatywnych widm Ramana. Ponadto, sprawdzono (**Michalska i in. 2017**), czy informatywne widma Ramana uzyskane po zastosowaniu procesu wstępnego naświetlania mogą być wykorzystane do rozwiązania problemu porównawczego z wykorzystaniem podejścia ilorazu wiarygodności. Metoda ta nie była dotychczas stosowana w ocenie wartości dowodowej widm Ramana uzyskanych po zastosowaniu tego procesu.

8.4.1 Ocena parametrów metody wstępnego naświetlania

Ocena metody wstępnego naświetlania obejmowała: wpływ parametrów naświetlania na szybkość redukcji fluorescencji, powtarzalność procesu wygaszania fluorescencji, trwałość wygaszenia fluorescencji, czy też wpływ przedłużającego się naświetlania na położenie, wygląd i stosunek intensywności wybranych pasm pochodzących od pigmentów, które ujawniono w wyniku tego procesu.

8.4.1.1 Wpływ parametrów naświetlania na szybkość redukcji fluorescencji

Ocenę wpływu parametrów procesu naświetlania na szybkość redukcji fluorescencji prowadzono na przykładzie dwóch próbek lakierów samochodowych – jednej typu metalik i jednej typu niemetalik (**Zięba-Palus i Michalska 2014b**). Dla każdej z próbek analizowano wpływ mocy lasera (LP) zastosowanego podczas naświetlania, jak również czasu naświetlania, na tzw. stopień redukcji fluorescencji w widmie Ramana, które rejestrowano po zastosowaniu tego procesu. Choć stopień redukcji fluorescencji przy zastosowaniu tych samych parametrów naświetlania był różny dla dwóch rozpatrywanych próbek, to zaobserwowano pewną zależność (rys. 10). Uzyskane wyniki pozwoliły stwierdzić, iż fluorescencja maleje wykładniczo w czasie, a stopień redukcji fluorescencji zależy od mocy lasera użytego podczas naświetlania. Im większa moc lasera użytego podczas naświetlania, tym szybsza redukcja fluorescencji. Stąd wydaje się, że w przypadku próbek lakierowych, dla których duża moc lasera nie może zostać wykorzystana z powodu degradacji termicznej próbki, podobne rezultaty można uzyskać stosując mniejszą moc lasera przy jednoczesnym wydłużeniu czasu naświetlania.



Rys. 10. Wpływ parametrów procesu naświetlania (czasu naświetlania oraz mocy lasera – *LP*) na stopień redukcji fluorescencji w widmie ramanowskim rejestrowanym dla lakieru typu niemetalik – próbka nr 4 z Tabeli A1, Załącznik A. Rysunek 1 w publikacji **Zięba-Palus i Michalska (2014b)**.

8.4.1.2 Analiza powtarzalności procesu wstępnego naświetlania

W tej części badań rozpatrywano, czy stopień wygaszenia fluorescencji w widmie ramanowskim dla danej próbki lakierowej jest procesem powtarzalnym. Ze względu na czasochłonność badań, powtarzalność tego procesu, oceniono na podstawie eksperymentów dotyczących jednej próbki lakieru typu niemetalik (próbka nr 4, tabela A1; załącznik A) i wybranej mocy lasera. Szczegóły eksperymentu zamieszczono w **Zięba-Palus i Michalska (2014b)**.

Otrzymane wyniki (tabela 13), sugerują iż stopień wygaszenia fluorescencji w widmie ramanowskim uzyskanym w wyniku zastosowania metody *photobleaching* jest powtarzalny (wartość względnego odchylenia standardowego dla większości czasów naświetlania wynosi poniżej 5% i tylko w dwóch przypadkach powyżej 10%). Niemniej jednak, aby wysnuć bardziej ogólne wnioski na temat powtarzalności metody konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań.

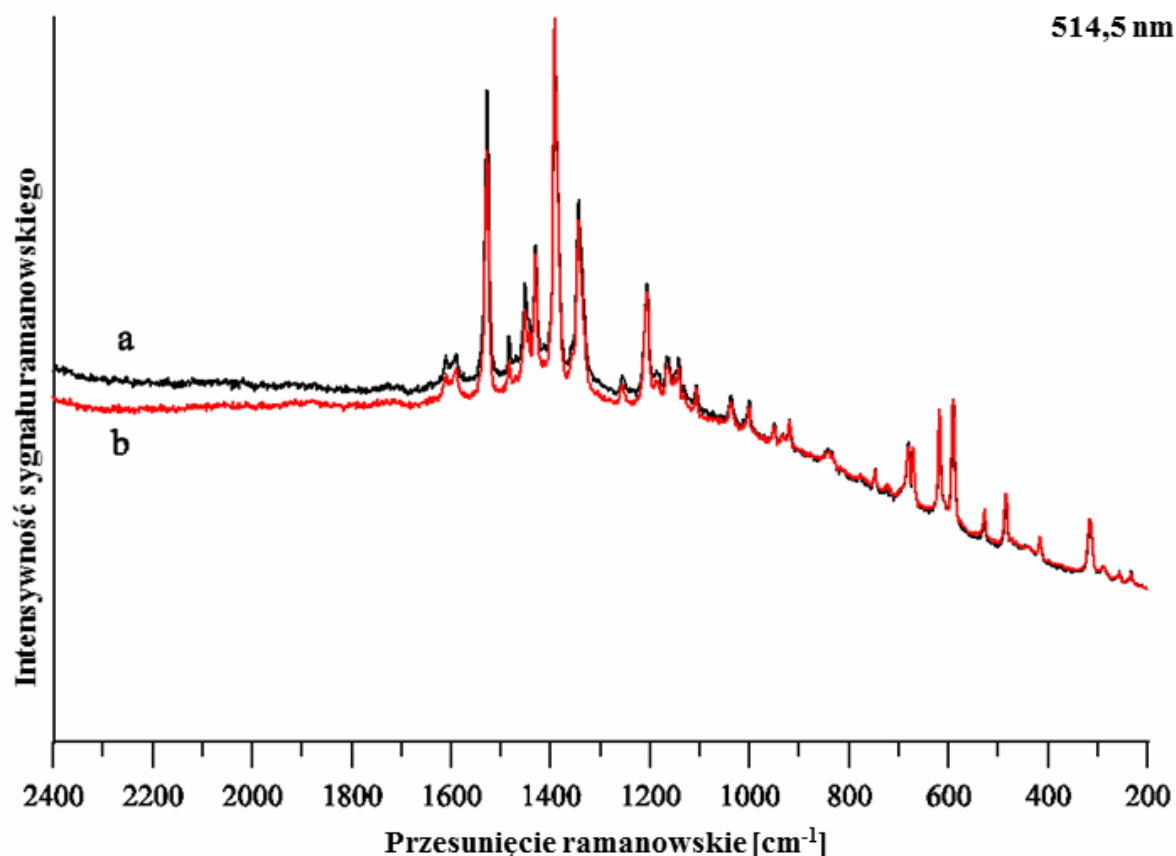
Tabela 13. Analiza powtarzalności procesu wygaszania fluorescencji przeprowadzona dla próbki nr 4 lakieru typu niemetalik (tabela A1; załącznik A) przy zastosowaniu podczas naświetleń 10% mocy lasera 514,5 nm. Tabela 3 w publikacji **Zięba-Palus i Michalska (2014b)**.

seria	Czas naświetlania próbki [min]												
	5	10	15	20	30	40	50	60	75	90	120	150	210
1	0,467 ^{a)}	0,283	0,277	0,247	0,197	0,172	0,153	0,137	0,110	0,096	0,077	0,067	0,050
2	0,431	0,327	0,264	0,231	0,191	0,166	0,144	0,126	0,111	0,099	0,078	0,067	0,052
3	0,462	0,347	0,292	0,248	0,201	0,164	0,141	0,124	0,114	0,102	0,090	0,078	0,061
średnia	0,453	0,319	0,278	0,242	0,197	0,168	0,146	0,129	0,112	0,099	0,082	0,071	0,054
RSD [%]	4,2	10,2	5,1	4,1	2,6	2,5	4,4	5,7	2,0	3,0	8,8	9,6	10,4

a) Stopień redukcji fluorescencji wyznaczony jako stosunek pola powierzchni pod linią bazową w zakresie spektralnym, w którym nie identyfikowano żadnych pasm, tj. 1290 – 1310 cm⁻¹, dla widma zarejestrowanego po zastosowaniu procesu wstępnego naświetlania do pola powierzchni obliczonego pod linią bazową dla tego samego zakresu spektralnego dla widma zarejestrowanego przed zastosowaniem tego procesu.

8.4.1.3 Analiza trwałości wygaszenia fluorescencji w wyniku procesu wstępnego naświetlania próbki

Podczas eksperymentów oceniano, czy proces wstępnego naświetlania pozwala wygaszić fluorescencję „chwilowo”, czy też trwale. Informatywne widma Ramana zarejestrowane zarówno natychmiast po zastosowaniu procesu wstępnego naświetlania lakieru, jak i po pewnym czasie (rys. 11) dowodzą, iż fluorescencja w miejscu naświetlania próbki zostaje wygaszona na stałe. Przyczyna tego zjawiska wciąż nie jest znana, niemniej jednak Autorka sugeruje, iż długotrwałe oddziaływanie lasera z powierzchnią próbki prowadzi do trwałego rozkładu fluorescencyjnych cząsteczek, które mogą w niej występować, np. w formie zanieczyszczeń. Fotolityczny rozkład części molekuł zmniejsza intensywność fluorescencji i sprawia, iż początkowo mniej intensywne pasma ramanowskie stają się widoczne. Fluorescencja obserwowana dla wybranych lakierów może być spowodowana również przez inne związki obecne w lakierze, które nie są identyfikowane metodą spektroskopii Ramana, a których „struktura” trwale zmienia się podczas naświetlania, co w konsekwencji wpływa na trwałe zmniejszenie efektu fluorescencji.

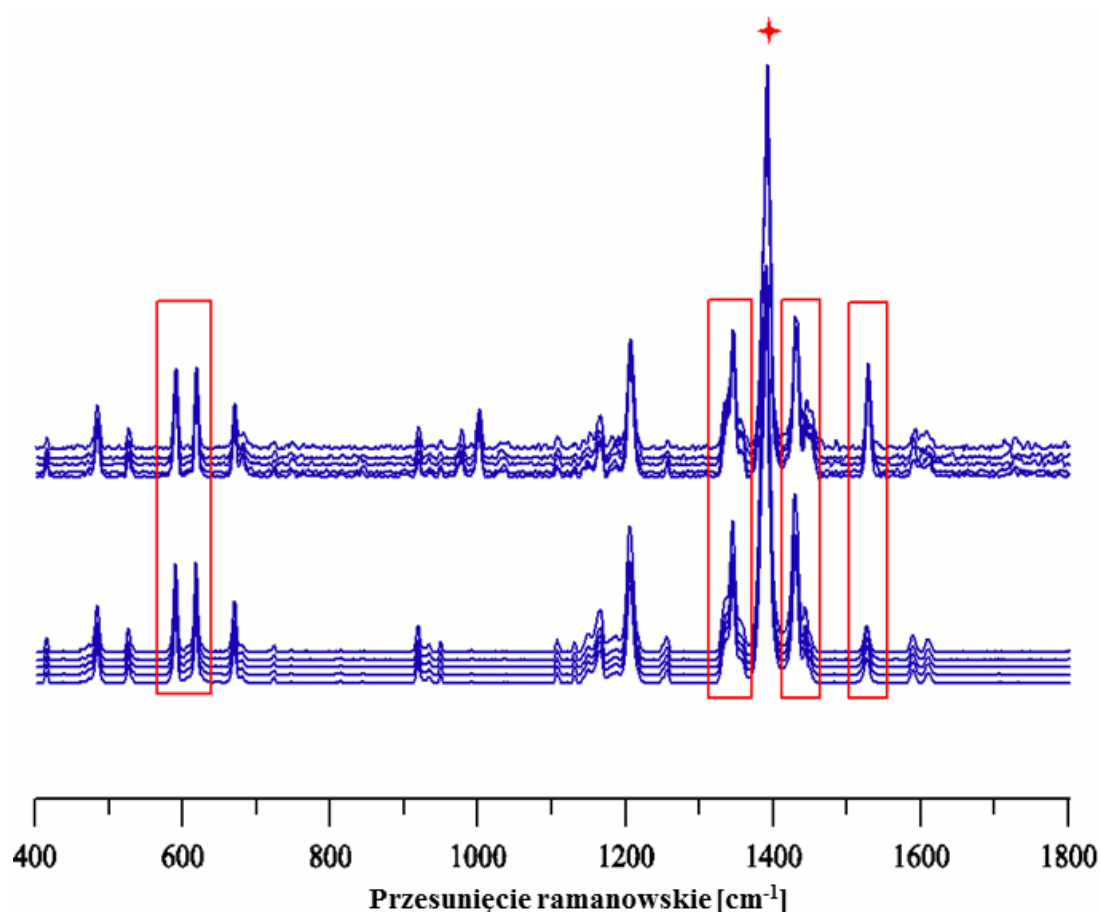


Rys. 11. Ocena trwałości wygaszania fluorescencji w procesie wstępnego naświetlania próbki – widma ramanowskie zarejestrowane dla lakieru typu niemetalik (próbka nr 4; tabela A1; załącznik A): (a) bezpośrednio po zastosowaniu procesu wstępnego naświetlania, (b) 24 h od zakończenia procesu naświetlania próbki. Rysunek 2 w publikacji **Zięba-Palus i Michalska (2014b)**.

8.4.2 Ocena wpływu procesu wstępnego naświetlania na pigmenty obecne w lakierze

Przed zastosowaniem metody wstępnego naświetlania do grupy niebieskich lakierów samochodowych wykazujących fluorescencję oceniono również, czy proces ten może wpływać negatywnie na pigmenty obecne w próbkach. Analizie poddano zarówno wpływ procesu naświetlania na położenie i kształt pasm pochodzących od pigmentów, a ujawnionych w widmie Ramana po zastosowaniu tego procesu, jak również oceniano, czy przedłużające naświetlanie lakieru prowadzi do degradacji pigmentu rozumianej jako zmianę stosunku pola powierzchni pod wybranym pasmem do pola powierzchni najintensywniejszego pasma w widmie rejestrowanym po wykonaniu naświetlania. Badania prowadzono na przykładzie trzech lakierów typu niemetalik, dla których w widmach Ramana uzyskanych po zastosowaniu procesu *photobleaching* zidentyfikowano pigmenty najczęściej występujące w tej grupie próbek, tj. lakieru nr 10 – PV 23 i PB 15 oraz lakierów nr 5 i 14 – PW 6 i PB 15 (tabela A1; załącznik A; *Eksperyment 8*). Szczegółowy opis eksperymentów można znaleźć w **Zięba-Palus i Michalska (2014b)** oraz w **Michalska i in. (2017)**.

Na podstawie przeprowadzonych badań ustalono, że kształt i położenie pasm pigmentów ujawnionych w widmach lakierów poddanych naświetlaniu nie różni się wizualnie od kształtu i położenia pasm tych pigmentów zidentyfikowanych w widmach lakierów nie poddanych temu procesowi (rys. 12 i 13 w niniejszym opracowaniu; **Zięba-Palus i Michalska 2014b**). Dodatkowo przedłużające się naświetlanie próbki nie wpływa istotnie na zmianę stosunku pól powierzchni obliczonych dla wybranych pasm pochodzących od pigmentów (**Michalska i in. 2017**). W odróżnieniu od innych badań (Golcuk i in. 2006, Macdonald i Wyeth 2006), zmiany te nie wykazują żadnej tendencji (rosnącej, czy malejącej) i są zdecydowanie mniejsze (patrz wartości *RSD*, tabela 14 i 15) niż zmiany stosunku pól powierzchni dla tych samych pasm obliczonych dla próbek lakierów kontrolnych, dla których informatywne widma Ramana uzyskiwano bez zastosowania procesu naświetlania.

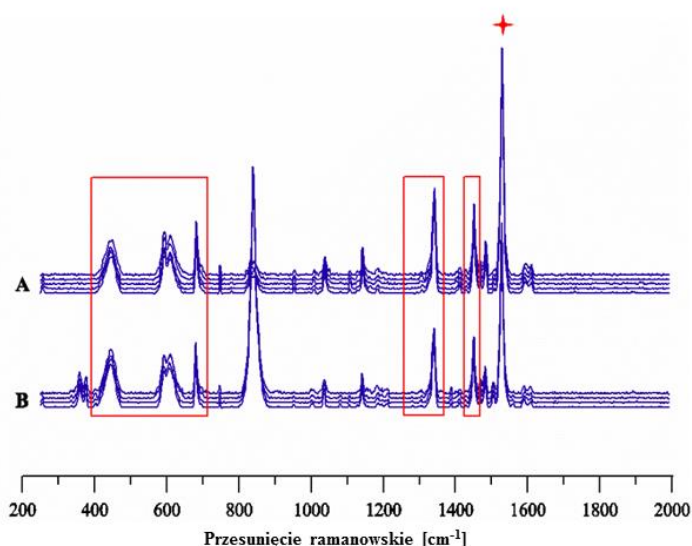


Rys. 12. Ocena wpływu procesu naświetlania na położenie i kształt pasm pochodzących od pigmentów PV23 i PB 15. W czerwonych ramkach znajdują się wytypowane pasma, których zmienność pól powierzchni analizowano. Gwiazdką oznaczono pasmo, względem którego normalizowano pola powierzchni wytypowanych pasm.

Tabela 14. Ocena wpływu długotrwałego naświetlania na pigmenty PV 23 i PB 15 obecne w lakierze. Tabela 6 w publikacji Michalska i in. (2017).

t_i [min]	PIGMENT				
	PV 23	PV 23	PV 23 + PB 15	PV 23	PB 15
	570 – 602 cm^{-1}	612 – 635 cm^{-1}	1320 – 1368 cm^{-1}	1412 – 1439 cm^{-1}	1515 – 1550 cm^{-1}
Lakier nr 10					
30	0,130 ^{a)}	0,120	0,398	0,302	0,156
45	0,124	0,119	0,411	0,296	0,158
60	0,131	0,122	0,393	0,303	0,170
75	0,130	0,122	0,388	0,301	0,190
90	0,134	0,124	0,375	0,297	0,162
średnia	0,130	0,122	0,393	0,300	0,167
RSD [%]	3,0	1,6	3,3	1,0	8,3
Lakiery kontrolny nr 6					
1	0,092	0,094	0,311	0,283	0,021
2	0,093	0,095	0,303	0,278	0,041
3	0,092	0,094	0,314	0,277	0,044
4	0,095	0,096	0,310	0,275	0,050
5	0,100	0,098	0,318	0,266	0,075
Średnia	0,095	0,095	0,311	0,276	0,046
RSD [%]	3,6	2,0	1,7	2,2	42,2

a) stosunek pola powierzchni wybranego pasma do pola powierzchni najbardziej intensywnego pasma w widmie Ramana (w tym przypadku pasma od pigmentu PV 23 oznaczonego na rys. 12 gwiazdką, zakres spektralny tego pasma wynosił 1368 – 1412 cm^{-1}).



Rys. 13. Ocena wpływu procesu naświetlania na położenie i kształt pasm pochodzących od pigmentów PV 6 i PB 15. W czerwonych ramkach znajdują się wytypowane pasma, których zmienność pól powierzchni analizowano, a gwiazdką oznaczono pasmo, względem którego normalizowano pola powierzchni wytypowanych pasm.

Tabela 15. Ocena wpływu długotrwałego naświetlania na pigmenty PW 6 i PB 15 obecne w lakierze. Tabela 7 w publikacji **Michalska i in. (2017)**.

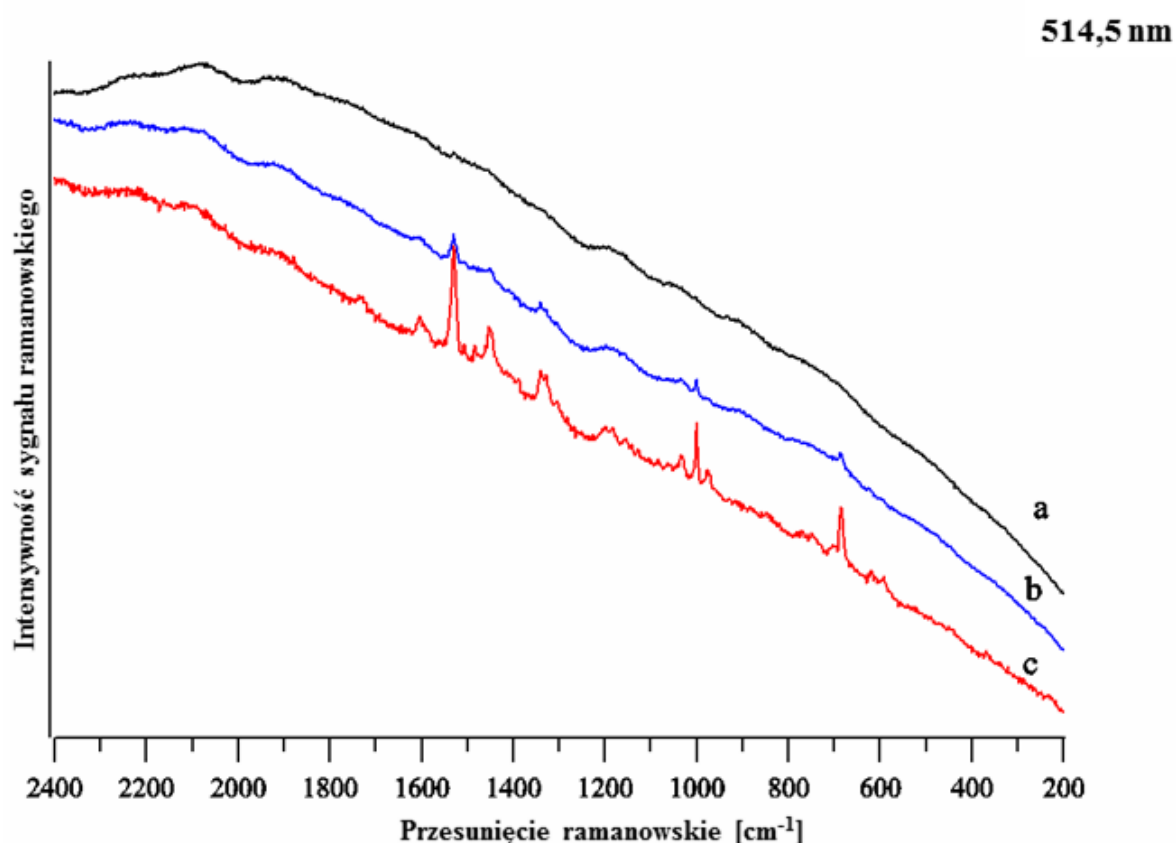
t_i [min]	PIGMENT				
	PW 6	PW 6+PB 15	PB 15	PB 15	PB 15
	380 – 500 cm^{-1}	540 – 660 cm^{-1}	680 – 710 cm^{-1}	1315 – 1355 cm^{-1}	1434 – 1462 cm^{-1}
lakier nr 14					
30	0,484 ^{a)}	0,670	0,242	0,441	0,251
45	0,457	0,630	0,219	0,421	0,255
60	0,512	0,687	0,219	0,410	0,254
75	0,439	0,674	0,211	0,409	0,260
90	0,457	0,663	0,210	0,418	0,260
średnia	0,470	0,665	0,220	0,420	0,56
RSD [%]	6,1	3,2	5,9	3,1	1,5
lakier kontrolny nr 1					
1	0,826	0,837	0,272	0,431	0,290
2	0,783	0,978	0,277	0,430	0,260
3	0,776	0,798	0,230	0,388	0,252
4	0,730	0,750	0,208	0,413	0,249
5	0,756	0,791	0,219	0,410	0,250
Średnia	0,774	0,831	0,241	0,414	0,260
RSD [%]	4,6	10,6	13,0	4,2	6,6

a) stosunek pola powierzchni wybranego pasma do pola powierzchni najbardziej intensywnego pasma w widmie Ramana (w tym przypadku pasma od pigmentu PB 15 oznaczonego na rys. 13 gwiazdką, zakres spektralny tego pasma wynosił 1515 – 1550 cm^{-1}).

8.4.3 Ocena efektywności procesu wstępnego naświetlania

Zastosowanie techniki wstępnego naświetlania dla wszystkich niebieskich lakierów samochodowych poddanych temu procesowi pozwoliło stwierdzić, iż obie grupy lakierów (metalik i niemetalik rozpatrywane oddzielnie) wymagają zastosowania innej mocy lasera podczas naświetlania. W przypadku lakierów typu metalik możliwe było zastosowanie 100% bądź 50% mocy lasera, podczas gdy w przypadku lakierów typu niemetalik moc lasera możliwa do zastosowania podczas naświetlania wynosiła 10% maksymalnej mocy tego lasera (15,5 mW). Dla lakierów typu niemetalik zastosowanie większej mocy lasera niż 10% powodowało widoczne zmiany termiczne obserwowane aż w 40% próbek (**Zięba-Palus i Michalska 2014b**). Niemniej jednak, gdy po zastosowanym procesie naświetlania zmiany termiczne naświetlanej powierzchni próbki nie były obserwowane, wówczas nie obserwowano również negatywnego wpływu procesu naświetlania na kształt, czy położenie ujawnionych pasm pigmentów.

Zastosowanie techniki *photobleaching* przed wykonaniem standardowych pomiarów ramanowskich do grupy 20 lakierów samochodowych pozwoliło wygasić lub zmniejszyć efekt fluorescencji w 90% próbek, umożliwiając tym samym identyfikację pigmentów. W widmach większości naświetlanych lakierów zostały ujawnione praktycznie wszystkie pasma pochodzące od danego pigmentu. Tylko w przypadku jednej próbki lakieru typu niemetalik nr 24 (tabela A1; załącznik A). naświetlanie spowodowało częściowe wygaszenie fluorescencji (rys. 14), w wyniku którego ujawniono jedynie cztery słabo intensywne pasma tj. 680, 1340, 1450 oraz 1529 cm^{-1} . Niemniej jednak, biorąc pod uwagę rodzaj pigmentów identyfikowanych dotychczas w próbkach niebieskich lakierach samochodowych (**Zięba-Palus i Michalska 2014a**), jak również fakt, że ujawnione pasma odpowiadają najbardziej intensywnym pasmom pochodzącym od ftalocyjaniny miedzi (PB 15; tabela 1) oraz informację, że, żaden inny pigment nie daje pasm w tym zakresie, stwierdzono że możliwa jest identyfikacja ftalocyjaniny miedzi (PB 15) w tej próbce. Tylko w przypadku dwóch lakierów typu metalik metoda wstępnego naświetlania spowodowała jedynie zmniejszenie intensywności fluorescencji, natomiast identyfikacja pigmentów wciąż nie była możliwa (**Zięba-Palus i Michalska 2014b**).



Rys. 14. Widma Ramana zarejestrowane dla próbki nr 24 lakieru typu niemetalik: a) bez zastosowania procesu naświetlania, b) po naświetlaniu lakieru przez 30 min laserem o mocy 50%, c) po 60 minutach naświetlania laserem o mocy 50%. Niebieskie punkty wskazują pasma na podstawie których zidentyfikowano pigment PB 15 (tabela 1). Rysunek pochodzi z publikacji **Zięba-Palus i Michalska (2014b)**.

8.4.4 Ocena wpływu parametrów naświetlania na interpretację widm Ramana w obrębie problemu porównawczego z wykorzystaniem podejścia ilorazu wiarygodności

W tej części badań oceniano, czy parametry procesu wstępnego naświetlania stosowanego przed standardowymi pomiarami ramanowskimi mogą mieć istotny wpływ na interpretację widm Ramana w ramach problemu porównawczego rozwiązywanego przy wykorzystaniu podejścia ilorazu wiarygodności (wykaz próbek użytych w eksperymentach zamieszczono w tabeli A1; załącznik A; *Eksperyment 8*). Aby ocenić, czy i który z parametrów procesu (moc lasera, czas naświetlania lakieru rozpatrywane oddzielnie) może wykazywać taki wpływ przeprowadzono następujące eksperymenty (**Michalska i in. 2017**). W przypadku oceny wpływu czasu naświetlania porównywano widma zarejestrowane dla konkretnej próbki lakierowej, w ten sposób iż widma uzyskane po procesie *photobleaching* przy stałej mocy i wybranym czasie naświetlania, np. 45 min, symulowały próbkę dowodową, a te zarejestrowane po procesie *photobleaching* wykonanym z użyciem tej samej mocy lasera lecz innym czasie naświetlania, np. 60 min, symulowały lakier dowodowy. Podobnie postąpiono oceniając wpływ mocy lasera, tym razem widma Ramana uzyskane dla konkretnej próbki lakierowej symulujące próbkę dowodową i porównawczą „różniły się” jedynie mocą lasera użytą do naświetlania danego obszaru próbki przed rejestracją widma. Podobnie, jak w podczas oceny wpływu obiektywu założono, że w przypadku braku wpływu testowanego parametru, modele *LR* będą dostarczały jedynie prawidłowych odpowiedzi (tj. $LR > 1$ wspierające hipotezę iż porównywane widma pochodzą z tej samej próbki), w przeciwnym razie odpowiedzi fałszywie negatywne ($LR < 1$ wspierające hipotezę, iż porównywane widma dotyczą różnych próbek) będą identyfikowane. Do oceny istotności badanych parametrów wykorzystano te same modele *LR*, które stosowano uprzednio do oceny wpływu powiększenia obiektywu dla tego typu próbek, tj. model dwuwymiarowy *LR*(PV23_7, PB15_10) oraz dwuwymiarowy *LR*(V_31, W_97) (tabela 10 w punkcie 8.3.2). Wyniki dotyczące oceny parametrów procesu *photobleaching* zamieszczono w tabelach 16 i 17. Szczegółowy opis przeprowadzonych eksperymentów i uzyskanych wyników można znaleźć w **Michalska i in. (2017)**.

Na podstawie wyników dostarczanych przez dwa typy modeli ilorazu wiarygodności (*LR-BA* oraz *LR-DWT*; tabele 16 i 17) ustalono, iż przy stałej mocy lasera, czas naświetlania lakieru podczas procesu *photobleaching* nie musi być kontrolowany. Wykorzystanie różnych czasów naświetlania przed pomiarami ramanowskimi nie wpływa bowiem na pojawianie się odpowiedzi fałszywie negatywnych dostarczanych przez modele *LR*. Podobnie w przypadku ustalonego czasu naświetlania można zamiennie stosować 5%, bądź 10% moc lasera bez wpływu na wnioskowanie w obrębie problemu porównawczego. Natomiast zmiana z 5%, bądź 10% mocy lasera (przy ustalonym czasie naświetlania lakieru) dla jednej próbki na 50% moc lasera dla drugiej z porównywanych może prowadzić do błędnych wniosków (tabela 17).

Tabela 16. Wpływ czasu naświetlania lakieru podczas procesu *photobleaching* na wnioskowanie (poziom odpowiedzi fałszywie negatywnych) w obrębie problemu porównawczego rozwiązywanego z wykorzystaniem modeli *LR-BA* oraz *LR-DWT*. Tabela 8 w publikacji Michalska i in. (2017).

Moc lasera	Modele LR									
	LR(PV23_7, PB15_10)					LR(V3_31, W3_97)				
Lakier nr 5 ^{a)}										
5%		45 min	60 min	75 min	90 min		45 min	60 min	75 min	90 min
	45 min	21 ^{b)}				45 min	135			
	60 min	294	184			60 min	315	53		
	75 min	195	443	13		75 min	525	320	195	
	90 min	211	450	469	136	90 min	303	292	397	73
10%	45 min	0,04				45 min	11			
	60 min	6	78			60 min	429	12		
	75 min	244	0,1	96		75 min	329	410	44	
	90 min	459	11	189	47	90 min	479	336	266	47
Lakier nr 10										
5%		45 min	60 min	75 min	90 min		45 min	60 min	75 min	90 min
	45 min	127				45 min	0,2			
	60 min	285	129			60 min	100	6		
	75 min	339	362	163		75 min	25	30	5	
	90 min	359	338	368	139	90 min	39	45	88	14
10%	45 min	140				45 min	3			
	60 min	352	146			60 min	79	14		
	75 min	356	361	147		75 min	67	90	40	
	90 min	317	286	305	110	90 min	49	68	68	21
50%	45 min	90				45 min	12			
	60 min	340	121			60 min	11	9		
	75 min	296	452	59		75 min	0,99	5	3	
	90 min	124	272	345	125	90 min	1.5	36	49	7
Lakier nr 14										
5%		45 min	60 min	75 min	90 min		45 min	60 min	75 min	90 min
	45 min	170				45 min	162			
	60 min	425	88			60 min	467	176		
	75 min	451	359	201		75 min	469	529	206	
	90 min	290	170	367	5	90 min	430	466	462	139
10%	45 min	135				45 min	0,004			
	60 min	347	199			60 min	166	3		
	75 min	440	430	186		75 min	126	321	10	
	90 min	457	403	465	211	90 min	44	91	360	78

a) informacje dotyczące lakierów można znaleźć w tabeli A1; załącznik A; *Eksperyment 8*.

b) wartość *LR* dostarczana przed dany model; $LR > 1$ spodziewana odpowiedź sugerująca brak wpływu testowanego parametru na wnioskowanie w obrębie problemu porównawczego. Szczegóły w opracowaniu.

Tabela 17. Wpływ mocy lasera użytej podczas procesu *photobleaching* na wnioskowanie (poziom odpowiedzi fałszywie negatywnych) w obrębie problemu porównawczego rozwiązywanego z wykorzystaniem modeli *LR-BA* oraz *LR-DWT*. Tabela 9 w publikacji Michalska i in. (2017).

Lakier		Czas naświetlania [min]											
		45			60			75			90		
LR(PV 23_7, PB 15_10)													
5 ^{a)}		5%	10%		5%	10%		5%	10%		5%	10%	
	5% ^{b)}	21 ^{c)}			184			13			136		
	10%	95	0.04		50	78		128	96		440	47	
14	5%	170			88			201			5		
	10%	463	135		258	199		465	186		318	211	
10		5%	10%	50%	5%	10%	50%	5%	10%	50%	5%	10%	50%
	5%	127			129			163			139		
	10%	179	140		220	146		224	147		234	110	
	50%	208	18	90	12	25	121	14	12	59	3	0,2	125
LR(V3_31, W3_97)													
5		5%	10%		5%	10%		5%	10%		5%	10%	
	5%	135			53			195			73		
	10%	1,7	11		88	12		28	44		2	47	
14	5%	162			177			206			139		
	10%	8	0,003		4	3		58	10		201	78	
10		5%	10%	50%	5%	10%	50%	5%	10%	50%	5%	10%	50%
	5%	0,2			5			5			14		
	10%	78	3		54	14		79	40		52	21	
	50%	49	39	12	0,6	2	9	0,05	0.006	3	0,1	0,02	7

a) informacje dotyczące lakierów można znaleźć w tabeli A1; załącznik A; *Eksperyment 8*,

b) moc lasera,

c) wartość *LR* dostarczana przed dany model; $LR > 1$ spodziewana odpowiedź sugerująca brak wpływu testowanego parametru na wnioskowanie w obrębie problemu porównawczego. Szczegóły w opracowaniu.

9. Podsumowanie

Celem pracy doktorskiej była ocena przydatności spektroskopii Ramana w analizie niebieskich lakierów samochodowych prowadzonej dla potrzeb wymiaru sprawiedliwości.

Na podstawie wykonanych badań ustalono, jakie pigmenty determinują kolor i odcień niebieskich lakierów samochodowych oraz jaka jest częstotliwość występowania danego składu pigmentowego w przebadanej populacji lakierów typu metalik i niemetalik (**Zięba-Palus i Michalska 2014a**).

Ze względu na fakt, iż weryfikacja hipotezy o wspólnym pochodzeniu próbek dowodowej i porównawczej prowadzona w ramach tzw. problemu porównawczego jest jednym z kluczowych elementów pracy eksperckiej, oceniono efektywność metody spektroskopii Ramana w różnicowaniu niebieskich lakierów pochodzących z różnych samochodów. Ze względu na fakt, iż nawet w przypadku niewielkiego odłamka lakierowego możliwe było rozróżnienie lakieru typu metalik od niemetalik, dla obu typów próbek taką analizę przeprowadzono oddzielnie. Na wstępnym etapie badań wyznaczono siłę dyskryminacyjną tej metody wykorzystując wciąż szeroko praktykowane wizualne porównanie widm (**Zięba-Palus i Michalska 2014a**). Niemniej, ze względu na duży subiektywizm tego podejścia, jak również brak możliwości oceny wartości dowodowej, jaką niosą za sobą widma, ich różnice, czy też podobieństwa, głównym celem pracy było zaproponowanie obiektywnej metody porównywania widm Ramana, a następnie zaimplementowanie opracowanego podejścia do realnych spraw w celu podniesienia jakości ekspertyz wykonywanych w Instytucie Ekspertyz Sądowych. Obiektywizację procesu podejmowania decyzji w ramach problemu porównawczego osiągnięto, co jest elementem nowości tej rozprawy, poprzez wykorzystanie do interpretacji widm Ramana podejścia ilorazu wiarygodności (*LR*). Podejście to pomimo tego, iż jest zalecane w naukach sądowych, nie było dotychczas stosowane do interpretacji widm Ramana, ze względu na problem z wymiarowością danych (każde widmo opisane jest przez kilkaset zmiennych).

W pracy omówiono trzy metody redukcji wymiarowości przestrzeni danych, które nie tylko ograniczały liczbę zmiennych opisujących widmo, ale pozwoliły jednocześnie zachować istotną informację umożliwiającą rozwiązanie problemu porównawczego próbek niebieskich lakierów samochodowych. W pierwszym podejściu nowe zmienne stanowiły pola powierzchni pod wybranymi pasmami (*band area*; *BA*) uznanymi za dystynktywne (**Michalska i in. 2015**), a w drugim zastosowano dyskretną transformację falkową – *DWT* (**Martyna i in. 2015**). W trzecim z proponowanych podejść widma zastąpiono reprezentacją wzajemnych podobieństw próbek (*DR*) wyrażoną miarami odległości (Manhattan, Euklidesa, kwadrat Euklidesa, Czebyszewa oraz bazującej na współczynniku korelacji Pearsona), którą następnie poddano liniowej analizie dyskryminacyjnej – *LDA* (**Martyna i in. 2016**). Nowe zmienne posłużyły do konstrukcji jedno- i wielowymiarowych modeli *LR* (*LR-BA*, *LR-DWT*, *LR-DR-LDA*), których poprawność oceniano analizując poziom odpowiedzi błędnych oraz

wyniki Empirycznej Entropii Krzyżowej. Poza zobiektywizowaniem procesu podejmowania decyzji w ramach problemu porównawczego, ustalono, iż bez względu na rodzaj wykorzystanych zmiennych, wielowymiarowe modele *LR* pozwoliły na lepsze, bądź przynajmniej porównywalne, rozróżnienie badanych lakierów (poziom odpowiedzi fałszywie pozytywnych), w stosunku do wciąż praktykowanego wizualnego porównania widm. Modele te uwzględniły również istotne informacje dotyczące niejednorodności badanych lakierów, co odzwierciedlało się w poziomie odpowiedzi fałszywie negatywnych, a nie było możliwe do ustalenia podczas klasycznej interpretacji widm. Ponadto, wnikliwa analiza wyników uzyskanych metodą klasyczną (wizualne porównanie widm) z tymi uzyskanymi z wykorzystaniem modeli *LR-BA* wykazała, iż większość próbek lakierów, dla których widma Ramana (785 nm) nie były możliwe do rozróżnienia metodą klasyczną, było możliwych do rozróżnienia przynajmniej z wykorzystaniem jednego z zaproponowanych modeli *LR*. Jednocześnie, nie zaobserwowano również przypadku, by widma wizualnie różne, nie były możliwe do rozróżnienia z wykorzystaniem podejścia ilorazu wiarygodności (**Michalska i in. 2015**).

Opracowane schematy interpretacji widm mogą być z powodzeniem wykorzystane w rozwiązaniu problemu porównawczego innych próbek opisanych przez widma Ramana, pod warunkiem dysponowania odpowiednią bazą danych.

Innym elementem nowości opisanym w rozprawie jest wnikliwa analiza procesu wstępnego naświetlania (*photobleaching*), którego przydatność do uzyskiwania informatywnych widm Ramana wykazano w przypadku analizy niebieskich lakierów samochodowych, których widma uzyskane w standardowych pomiarach ramanowskich charakteryzowały się jedynie fluorescencją (**Zięba-Palus i Michalska 2014b**). Zastosowanie techniki *photobleaching* do grupy 20 próbek pozwoliło wygasić lub zmniejszyć efekt fluorescencji w 90% przebadanych lakierów umożliwiając tym samym identyfikację pigmentów. Badania wykazały, że wygaszenie fluorescencji w wyniku zastosowania tej metody jest procesem trwałym i powtarzalnym, a co najważniejsze nie wpływa niszcząco na pigmenty obecne w lakierze (**Zięba-Palus i Michalska 2014b, Michalska i in. 2017**).

Ponadto, pionierski element pracy stanowi również ocena parametrów analitycznych mogących mieć wpływ na wnioskowanie w obrębie problemu porównawczego widm Ramana rozwiązywanego w oparciu o zaproponowane testy ilorazu wiarygodności. Badania wykazały, iż podczas ogniskowania się na powierzchni próbki dowodowej, jak i porównawczej, należy wykorzystać to samo powiększenie obiektywu, tj. 50× (co ustalono na podstawie wyników testu F). W przypadku analizy próbek fluorescencyjnych, przed wykonaniem pomiarów ramanowskich można z powodzeniem wykorzystać metodę wstępnego naświetlania w taki sposób, że przy jednym stałym parametrze procesu, np. mocy lasera ustalonym dla próbki dowodowej i porównawczej, drugi, tj. czas naświetlania, nie musi być kontrolowany (**Michalska i in. 2017**).

10. Literatura

Aitken CGG , Taroni F **2004**, Statistics and the evaluation of evidence for forensic scientists, Wiley and Sons, Chichester.

Aitken CGG, Zadora G, Lucy D **2007** A two-level model for evidence evaluation. *Journal of Forensic Sciences* 52(2), 412-419.

Bell SEJ, Fido LA, Speers SJ, Armstrong WJ **2005** Rapid Forensic Analysis and Identification of “Lilac” Architectural Finishes Using Raman Spectroscopy. *Applied Spectroscopy* 59(1), 100-08.

Buzzini P, Massonnet G **2004** A market study of green spray paints by Fourier Transform infrared (FTIR) and Raman spectroscopy. *Science & Justice* 44(3), 123-131.

Buzzini P, Massonnet G, Sermier FM **2006** The micro Raman analysis of paint evidence in criminalistics: case studies. *Journal of Raman Spectroscopy* 37, 922-931.

Buzzini P, Suzuki E **2015** Forensic applications of Raman spectroscopy for the in situ analyses of pigments and dyes in ink and paint evidence. *Journal of Raman Spectroscopy*, 47 16-27.

Caddy B (Ed) **2001** Forensic Examination of Glass and Paint – Analysis and Interpretation, Taylor & Francis, CRC Press London New York.

Daubechies I **1990** The wavelet transform, time-frequency localization and signal analysis. *IEEE T. Transcations and Information Theory* 36, 961-1005.

Defeyt C, van Pevenage J, Moens L, Strivay D, Vandenabeele P **2013** Micro-Raman spectroscopy and chemometrical analysis for the distinction of copper phthalocyanine polymorphs in paint layers. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 115, 636-640.

de Gelder J, Vandenabeele P, Govaert F, Moens L **2005** Forensic analysis of automotive paints by Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy* 36, 1059-67.

Ferreira KB, Oliveira AGG, Gomes JA **2017** Raman spectroscopy of automotive paints: Forensic analysis of variability and spectral quality, *Spectroscopy Letters* 50(2), 102-110.

Gregory P **2000** Industrial applications of phthalocyanines. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* 4(4), 432-437.

Golcuk K, Mandair GS, Callender AF, Sahar N, Kohn DH, Morris MD **2006** Is photobleaching necessary for Raman imaging of bone tissue using a green laser? *Biochimica et Biophysica Acta* 1758, 868-873.

Heitzman S **2011** Indanthrone pigments for polymers and coatings. *Polymers Paint Colour Journal* 201(4562), 24-27.

Jędrychowska S **2012** Możliwości wykorzystania spektroskopii ramanowskiej w branży naftowej. Część 1. Podstawy teoretyczne spektroskopii ramanowskiej. *Nafta-Gaz*, 11, 842-849.

Kuptsov AH **1994** Application of Fourier transform Raman spectroscopy in forensic science. *Journal of Forensic Science* 39, 305-318.

Lambert D, Muehlethaler C, Gueissaz L, Massonnet G **2014** Raman analysis of multilayer automotive paints in forensic science :measurement variability and depth profile, *Journal of Raman Spectroscopy* 45, 1285-1292.

Macdonald AM, Wyeth P **2006** On the use of photobleaching to reduce fluorescence background in Raman spectroscopy to improve the reliability of pigment identification on painted textiles. *Journal of Raman spectroscopy* 37, 830-835.

Martyna A, Michalska A, Zadora G **2015** Interpretation of FTIR spectra of polymers and Raman spectra of car paints by means of likelihood ratio approach supported by wavelettransform for reducing data dimensionality. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407, 3357-3376.

Martyna A, Zadora G, Neocleous T, Michalska A, Dean N. **2016** Hybrid approach combining chemometrics and likelihood ratio framework for reporting the evidential value of spectra. *Analytica Chimica Acta* 931, 34-46.

Massonnet G, Stoecklein W **1999a** Identification of organic pigments in coatings: applications to red automotive topcoats. Part I: Thin layer chromatography with direct visible microspectrophotometric detection. *Science & Justice* 39(2), 128-134.

Massonnet G, Stoecklein W **1999b** Identification of organic pigments in coatings: applications to red automotive topcoats. Part II: Infrared spectroscopy. *Science & Justice* 39(2), 135-140.

Massonnet G, Stoecklein W **1999c** Identification of organic pigments in coatings: applications to red automotive topcoats. Part III: Raman Spectroscopy. *Science & Justice* 39(3), 181-187.

Mazurski J **2016** Chemometria praktyczna - Interpretuj wyniki swoich pomiarów. wyd. II. Wydawnictwo Malamut

Michalska A, Martyna A, Zięba-Palus J, Zadora G **2015** Application of likelihood ratio approach in solving a comparison of Raman spectra recorded for blue automotive paints. *Journal of Raman Spectroscopy* 46, 772-783.

Michalska A, Martyna A, Zadora G **2017** Investigation of various factors influencing Raman spectra interpretation with the use of likelihood ratio approach. *Forensic Science International* 10.1016/j.forsciint.2017.10.034.

Muehlethaler C, Massonnet G, Esseiva P **2011** The application of chemometrics on Infrared and Raman spectra as a tool for the forensic analysis of paints. *Forensic Science International* 209, 173 -182.

Muehlethaler C, Massonnet G, Deviterne M, Bradley M, Herrero A, de Lezana ID, Lauper S, Dubois D, Geyer-Lippmann J, Ketterer S, Milet S, Bertrand M, Langer W, Plage B, Gorzawski G, Lamothe V, Marsh L, Turunen R **2013** Survey on batch-to-batch variation in spray paints: A collaborative study. *Forensic Science International* 229, 80-91.

Navas N, Romero-Pastor J, Manzano E, Cardell C **2010** Raman spectroscopic discrimination of pigments and tempera paint model samples by principal component analysis on first-derivative spectra. *Journal of Raman Spectroscopy* 41, 1486-1493.

Nieznańska J, Zięba-Palus J, Kościelniak P **1999** Badania fizykochemiczne samochodowych powłok lakierowych, *Problems of Forensic Sciences* 39, 77-94.

Palenik CS, Palenik S, Groves E, Herb J **2014** Raman Spectroscopy of Automotive and Architectural Paints: In situ Pigment Identification and Evidentiary Significance www.ncjrs.gov/pdffiles1/nij/grants/243162.pdf (accessed 12.03.2014).

Ramos D **2007** Forensic Evaluation of the Evidence Using Automatic Speaker Recognition Systems, Universidad Autonoma de Madrid (praca doktorska).

- Ryland SG, Jergovich TA, Kirkbride KP **2006** Current trends in forensic paint examination. *Forensic Science Review* 18, 98-117.
- Silverman B **1986** Density estimation for statistics and data analysis. Chapman and Hall, London, UK.
- Skenderovska M, Minčeva-Šukarova B, Andreeva L **2008** Application of micro-Raman and FT-IR spectroscopy in forensic analysis of automotive topcoats in the republic of Macedonia. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering* 27(1), 9-17.
- Stanimiriva I, Daszykowski M, Walczak B **2008** Metody uczenia z nadzorem – kalibracja, dyskryminacja i klasyfikacja. (In) Zuba D, Parczewski A (Eds.), *Chemometria w analityce – wybrane zagadnienia*. Wydawnictwo Instytutu Ekspertyz Sądowych w Krakowie.
- Suzuki EM, Carrabba M **2001** In situ identification and analysis of automotive paint pigments using line segment excitation Raman spectroscopy. *Journal of Forensic Science* 46, 1053-1069.
- Thompson B **2009** Shades of blue. *Polymers Paint Colour Journal* 199(4542), 31-32.
- Walczak B, Massart D **1997** Noise suppression and signal compression using wavelet packet transform. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 36, 81–94.
- Wei D, Chen S, Liu Q **2015** Review of Fluorescence Suppression Techniques in Raman Spectroscopy. *Applied Spectroscopy Reviews* 50, 387-406.
- Zadora G, Martyna A, Ramos D, Aitken CGG **2014** Statistical Analysis in Forensic Science Evidential Values of Multivariate Physicochemical Data. Wiley and Sons, Chichester.
- Zadora G **2015** Sposoby interpretacji danych pochodzących z badań fizykochemicznych [w:] Zięba-Palus J, Mikroślady i ich znaczenie w postępowaniu przygotowawczym i sądowym. Wydawnictwo Instytutu Ekspertyz Sądowych, Kraków.
- Zięba-Palus J **2002** Badania lakierów samochodowych, [w:] Kościelniak P, Piekoszewski W, *Chemia sądowa*, Wydawnictwo Instytutu Ekspertyz Sądowych.
- Zięba-Palus J, Zadora G, Milczarek JM, Kościelniak P **2008** Pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry analysis as a useful tool in forensic examination of automotive paint traces. *Journal of Chromatography A* 1179, 41-46.
- Zięba-Palus J, Michalska A, Wesełucha-Birczyńska **2011** A characterisation of paint samples by infrared and Raman spectroscopy for criminalistic purposes. *Journal of Molecular Structure* 993, 134-141.
- Zięba-Palus J, Wąs-Gubała J **2011** An investigation into the use of micro-Raman spectroscopy for the analysis of car paints and single textile fibre. *Journal of Molecular Structure* 993, 127-133.
- Zięba-Palus J, Trzcińska BM **2012** Study of pigments composition in paint traces by microspectrometric techniques. *Problems of Forensic Sciences* 89, 5-16.
- Zięba-Palus J, Michalska A **2014a** Characterization of Blue Pigments Used in Automotive Paints by Raman Spectroscopy. *Journal of Forensic Science* 59(4), 943-949.
- Zięba-Palus J, Michalska A **2014b** Photobleaching as a useful technique in reducing of fluorescence in Raman spectra of blue automobile paint samples. *Vibrational Spectroscopy* 74, 6-12.

Zięba-Palus J **2015** Analiza śladów lakieru [w:] Zięba-Palus, Mikroślady i ich znaczenie w postępowaniu przygotowawczym i sądowym. Wydawnictwo Instytutu Ekspertyz Sądowych, Kraków.

ZAŁĄCZNIK A

Załącznik A – Tabele i rysunki

Tabela A1. Próbkki niebieskich lakierów samochodowych typu niemetalik wykorzystane podczas badań.

Nr lakieru	Pochodzenie	Eksperyment ^{a)}							
		E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8
1	Citroen	X ^{b)}	X	X	X			X	
2	Fiat 126p	X	X	X	X			X	
3	Fiat Seicento	X	X	X	X		X		
4	Fiat 126p	X	X	X	X		X		
5	Fiat 125p	X	X	X	X		X		X
6	Renault Twingo	X	X	X	X	X		X	
7	Łada	X	X	X	X			X	
8	Łada	X	X	X	X		X		
9	Fiat 126p	X	X	X	X	X		X	
10	Citroen	X	X	X	X				X
11	Citroen	X	X	X	X			X	
12	VW	X	X	X	X		X		
13	Suzuki	X	X	X	X			X	
14	Lada	X	X	X	X		X		X
15	Renault Megane	X	X	X	X			X	
16	Citroen	X	X	X	X		X		
17	Fiat 126p	X	X	X	X			X	
18	Polonez	X	X	X	X				
19	Skoda	X	X	X	X			X	
20	Polonez	X							
21	Renault Twingo	X	X	X	X				
22	Fiat Punto	X	X	X	X		X		
23	Polonez	X	X	X	X			X	
24	Polonez	X	X	X	X		X		
25	Opel Astra	X	X	X	X	X		X	
26	Fiat Seicento	X	X	X	X	X		X	
27	VW Golf							X	
28	Fiat 125p							X	
29	Ford Escord							X	
30	Ford Fiesta GL							X	
31	Renault Fengo					X		X	
32	nn						X		

a) E1 – próbki, dla których uzyskano widma ramanowskie przy wykorzystaniu 3 źródeł wzbudzenia, tj. lasera 514,5 nm, 632,8 nm oraz 785 nm. Dane te wykorzystano do identyfikacji składu pigmentowego i do oceny siły dyskryminacyjnej metody przy wykorzystaniu wizualnego porównania widm.

E2 – próbki, których widma (785 nm) posłużyły do konstrukcji modeli *LR-BA*.

E3 – próbki, których widma (785 nm) posłużyły do konstrukcji modeli *LR-DWT*.

E4 – próbki, których widma (785 nm) posłużyły do konstrukcji modeli *LR-DR-LDA*.

E5 – próbki, na podstawie których testowano wpływ powiększenia obiektywu.

E6 – próbki, na podstawie których testowano efektywność procesu naświetlania.

E7 – próbki, których widma (514,5 nm) posłużyły do konstrukcji modeli *LR-BA* oraz *LR-DWT*.

E8 – próbki, na podstawie których testowano parametry procesu naświetlania.

X – próbka lakieru, której widma wykorzystano w danym eksperymencie.

Tabela A2. Próbki niebieskich lakierów samochodowych typu metalik wykorzystane podczas badań.

Nr lakieru	Pochodzenie	Eksperyment ^{a)}						
		E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7
1	Ford Sierra	X ^{b)}	X	X	X		X	
2	Fiat 126p	X	X	X	X		X	
3	Fiat 126p	X						
4	Fiat 126p	X	X	X	X		X	
5	VW Golf	X	X	X	X			
6	Citroen	X	X	X	X		X	
7	Fiat	X						
8	Toyota Camry	X	X	X	X		X	
9	Citroen	X	X	X	X		X	
10	Citroen	X	X	X	X			X
11	Citroen	X	X	X	X			X
12	Volvo	X	X	X	X		X	
13	VW	X						
14	VW	X	X	X	X			
15	VW	X						
16	Citroen	X						
17	Suzuki	X						
18	Suzuki	X						
19	Kia	X					X	
20	Subaru	X	X	X	X			
21	Fiat Seicento	X	X	X	X			
22	Honda Civic	X	X	X	X			X
23	Citroen Saxo	X	X	X	X	X		X
24	Citroen	X	X	X	X			X
25	Renault Clio RN	X	X	X	X		X	
26	BMW	X	X	X	X	X		X
27	nn	X	X	X	X			X
28	nn	X						X
29	nn	X	X	X	X			X
30	VW Passat	X	X	X	X			X
31	Fiat Cinquecento	X	X	X	X			
32	Ford Escort	X	X	X	X			X
33	Opel Astra	X	X	X	X			X
34	Mazda 3	X	X	X	X	X		X
35	Alfa Romeo	X	X	X	X			X
36	Vauxhall Vestra 2.0	X	X	X	X	X		X
37	VW Golf	X	X	X	X			X
38	Volvo S40	X	X	X	X			
39	Nissan	X	X	X	X		X	
40	Fiat Uno	X				X		X

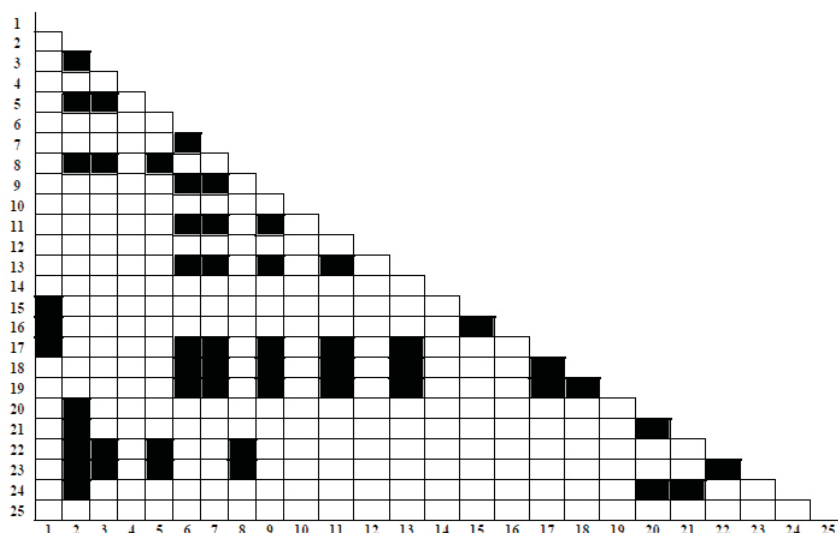
a) E1 – próbki, dla których uzyskano widma ramanowskie przy wykorzystaniu 3 źródeł wzbudzenia, tj. lasera 514,5 nm, 632,8 nm oraz 785 nm. Dane te wykorzystano do identyfikacji składu pigmentowego i do oceny siły dyskryminacyjnej metody przy wykorzystaniu wizualnego porównania widm.

E2 – próbki, których widma (785 nm) posłużyły do konstrukcji modeli *LR-BA*.

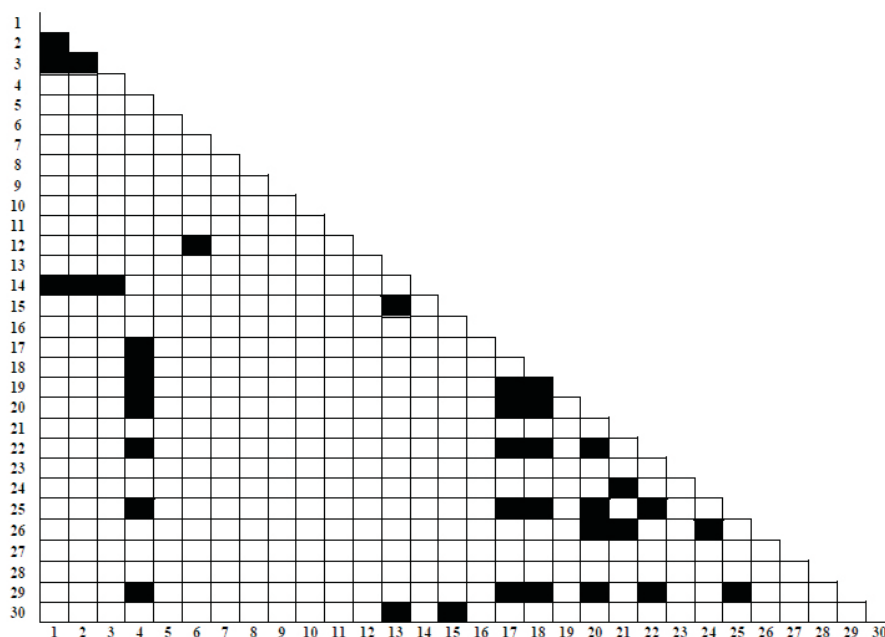
E3 – próbki, których widma (785 nm) posłużyły do konstrukcji modeli *LR-DWT*.

E4 – próbki, których widma (785 nm) posłużyły do konstrukcji modeli *LR-DR-LDA*.

- E5 – próbki, na podstawie których testowano wpływ powiększenia obiektywu.
E6 – próbki, na podstawie których testowano efektywność procesu naświetlania.
E7 – próbki, których widma (514,5 nm) posłużyły do konstrukcji modeli *LR-BA* oraz *LR-DWT*.
X – próbka lakieru, której widma wykorzystano w danym eksperymencie.



Rys. A1. Wyniki dotyczące wizualnego porównania widm niebieskich lakierów samochodowych typu niemetalik uzyskanych przy długości linii wzbudzającej 785 nm (wykaz próbek załącznik A1; *Eksperyment 2*). Czarne pole oznacza brak możliwości rozróżnienia próbek na podstawie wizualnego porównania widm skutkujące pojawieniem się odpowiedzi fałszywie pozytywnej. Tabela 2 w publikacji **Michalska i in. (2015)**.



Rys. A2. Wyniki dotyczące wizualnego porównania widm niebieskich lakierów samochodowych typu metalik uzyskanych przy długości linii wzbudzającej 785 nm (wykaz próbek załącznik A2; *Eksperyment 2*). Czarne pole oznacza brak możliwości rozróżnienia próbek na podstawie wizualnego porównania widm skutkujące pojawieniem się odpowiedzi fałszywie pozytywnej. Tabela S2 w publikacji **Michalska i in. (2015)**.

ZAŁĄCZNIK B

Załącznik B – prace opublikowane wchodzące w cykl rozprawy doktorskiej

Dane bibliograficzne		Współczynnik oddziaływania (IF)	Punkty MNiSW
Prace opublikowane			
Publikacja 1 (Zięba-Palus i Michalska 2014a) [§]	Zięba-Palus J.*, Michalska A. , Characterisation of blue pigments used in automotive paints by Raman spectroscopy. Journal of Forensic Sciences 2014 (59) 943-949	1,160	30
Publikacja 2 (Zięba-Palus i Michalska 2014b)	Zięba-Palus J.*, Michalska A. , Photobleaching as an useful technique in reducing of fluorescence in Raman spectra of blue automobile paint samples. Vibrational Spectroscopy 2014 (74) 6-12	2,003	25
Publikacja 3 (Michalska i in. 2015)	Michalska A. , Martyna A., Zięba-Palus J., Zadora G.*, Application of a likelihood ratio approach in solving a comparison problem of Raman spectra recorded for blue automotive paints. Journal of Raman Spectroscopy 2015 (46) 772-783. IF=2,671	2,671	30
Publikacja 4 (Martyna i in. 2015)	Martyna A., Michalska A. , Zadora G.*, Interpretation of FTIR spectra of polymers and Raman spectra of car paints by means of likelihood ratio approach supported by wavelet transform for reducing data dimensionality. Analytical and Bioanalytical Chemistry 2015 (407) 3357-3376	3,436	40
Publikacja 5 (Martyna i in. 2016)	Martyna A., Zadora G.*, Neocleous T., Michalska A. , Dean N., Hybrid approach combining chemometrics and likelihood ratio framework for reporting the evidential value of spectra. Analytica Chimica Acta 2016 (931) 34-46	4,513	45
Publikacja 6 (Michalska i in. 2017)	Michalska A.* , Martyna A., Zadora G., Investigation of various factors influencing Raman spectra interpretation with the use of likelihood ratio approach. Forensic Science International 10.1016/j.forsciint.2017.10.034	1,989	40
Łącznie:		15,772	210

§ - sposób cytowania publikacji w rozprawie doktorskiej,

* - autor korespondencyjny.

Publikacja 1

Tytuł:	Characterisation of blue pigments used in automotive paints by Raman spectroscopy
Autorzy:	Zięba-Palus J., Michalska A.
Czasopismo:	<i>Journal of Forensic Sciences</i>
Wartość <i>Impact Factor</i> :	1,160
Punkty MNiSW:	30
Cytowana w rozprawie jako:	Zięba-Palus i Michalska 2014a

PAPER

CRIMINALISTICS

J Forensic Sci, July 2014, Vol. 59, No. 4
doi: 10.1111/1556-4029.12499
Available online at: onlinelibrary.wiley.com

Janina Zięba-Palus,¹ Ph.D.; and Aleksandra Michalska,¹ M.Sc.

Characterization of Blue Pigments Used in Automotive Paints by Raman Spectroscopy*

ABSTRACT: Micro-Raman spectroscopy was applied to forensic identification of pigments in paint chips and provided differentiation between paint samples. Sixty-six blue automotive paint samples, 26 solid and 40 metallic were examined. It was found that the majority of the collected Raman spectra provided information about the pigments present. However, in some cases, fluorescence precluded pigment identification. Using laser excitation at longer wavelengths or pretreatment to effect photobleaching often resulted in reduced fluorescence, particularly for solid color samples, and allowed pigment identification. The examined samples were compared pairwise taking into account number, location, and intensity of absorption bands in their infrared spectra. The estimated discrimination power ranged from 97% for solid paint samples to 99% for metallic paint samples.

KEYWORDS: forensic science, forensic examination, car paints, Micro-Raman spectroscopy, pigment identification, discrimination, photobleaching

The forensic examination of recovered automotive paint chips often includes determination of chemical content and comparison to paint originating from the suspect vehicle. Microspectrometric methods, which often enable examination *in situ* of a very small amount of sample, are usually performed using IR spectroscopy, which readily detects the binder type as well as some inorganic pigments and extenders (1–3). The identification of many organic pigments present in a paint trace is difficult by the use of infrared spectroscopy because their content is too low for detection, for example blue and green organic pigments in automotive finishes. Microspectrophotometry in the visible range is routinely carried out for color comparison of paint fragments (4,5). Raman spectroscopy has been proven to be a useful tool in the forensic examination of pigments (6–10). The nondestructive nature of this analytical procedure and the possibility of selectively exciting various components through the use of different excitation wavelengths provide an attractive alternative to infrared spectroscopy. Further, this method is quite rapid and requires no sample preparation.

The usefulness of the Raman technique in the identification of inorganic pigments and resins for forensic purposes was demonstrated by Kuptsov (10) and Suzuki et al. (11). Moreover, some authors described the types of both inorganic and organic pigments identified in paints (9,12–16); however, these results were based on the examinations of small numbers of samples of chosen colors. Characterization of pigment distribution in a

cross section of automotive paint by the use of the Raman mapping technique was also carried out (17). So far, the Raman method has been applied as a complementary technique to infrared spectroscopy in studies of some black, red and green (18,19,21) spray paints as well as green automotive paints (20) available on the market. It helped to differentiate samples coming from different sources and to establish a chemical profile of the paints. However, some difficulties were observed concerning the occurrence of strong fluorescence produced by paint components that may overwhelm the weaker Raman scattering peaks (21). The application of an FT Raman instrument with a near-infrared laser minimized the problems with fluorescence (10,22,23).

There is still a need for the development of a consistent methodology allowing a comparative analysis of paint samples. The aim of this study was to examine pigment content of different paint samples of the same color and to evaluate the usefulness of Raman spectroscopy for discriminating between blue automotive paint samples having both metallic and solid color finishes. The problem of fluorescence was overcome by using different excitation lasers and/or exploiting the photobleaching method.

Materials and Methods

Fragments of 26 solid and 40 metallic blue car paints of different shades originating from bodies of damaged cars were examined (Table 1). The examined samples were collected during 5–7 year period of time from the car bodies of cars of different makers and different years of production. Their colors and shade, evaluated visually, were very similar.

Raman spectra were obtained using a Renishaw inVia spectrometer equipped with a confocal Leica microscope and three types of excitation source: Argon ion (514 nm), Helium-Neon

¹Institute of Forensic Research, Westerplatte 9, 31-033 Krakow, Poland.

*Supported in part by the Polish Ministry of Higher Education, Project No. 0 N204 115036, and by Institute of Forensic Research, Project No. III/K 2009-2011.

Received 18 Dec. 2012; and in revised form 25 April 2013; accepted 22 June 2013.

TABLE 1—Examined paint samples.

No.	Paint Type	Vehicle	No.	Paint Type	Vehicle	No.	Paint Type	Vehicle
1	Solid	Citroen	1	Metallic	Ford Sierra	27	Metallic	Unknown
2		Fiat 126p	2		Fiat 126p	28		Unknown
3		Fiat Seicento	3		Fiat 126p	29		Unknown
4		Fiat 126p	4		Fiat 126p	30		VW Passat
5		Fiat 125p	5		VW Golf	31		Fiat Cinquecento
6		Renault Twingo	6		Citroen	32		Ford Escort
7		Lada	7		Fiat	33		Opel Astra
8		Lada	8		Toyota Camry	34		Mazda 3
9		Fiat 126p	9		Citroen	35		Alfa Romeo
10		Citroen	10		Citroen	36		Vauxhall Vectra 2.0
11	Metallic	Citroen	11	Metallic	Citroen	37	Metallic	VW Golf
12		VW	12		Volvo	38		Volvo S40
13		Suzuki	13		VW	39		Nissan
14		Lada	14		VW	40		Fiat Uno
15		Renault Megane	15		VW			
16		Citroen	16		Citroen			
17		Fiat 126p	17		Suzuki			
18		Polonez	18		Suzuki			
19		Skoda	19		Kia			
20		Polonez	20		Subaru			
21		Renault Twingo	21		Fiat Seicento			
22		Fiat Punto	22		Honda Civic			
23		Polonez	23		Citroen Saxo			
24		Polonez	24		Citroen			
25		Opel Astra	25		Renault Clio RN			
26		Fiat Seicento	26		BMW			

(633 nm), and a near-infrared semiconductor laser at 785 nm. The laser beam was focused on samples by a 50× (N.A. = 0.75) objective lens, which gives a theoretical spot size of $c. 2 \mu\text{m}$. The light was dispersed by a diffraction grating with 2400 grooves/mm for the 514 nm laser and 1200 grooves/mm for 633 and 785 nm. The signal was recorded using a Peltier-cooled charge-coupled device (CCD). Spectral data were processed with Renishaw Wire 3.2 software (Renishaw plc, Watton-under-Edge, Gloucestershire, UK).

The samples were analyzed *in situ* in reflection mode, from the surface. The surface of the sample was cleaned with alcohol before measurements. Spectra were recorded in the 200–2500/cm region with an acquisition time of 10 sec and collection of five accumulations. Each paint sample was measured three times in different spots to check its homogeneity.

The photobleaching method was applied to reduce the fluorescence of paint sample. So, the samples were irradiated with the appropriate laser for several minutes before the measurement. The laser power and duration of the irradiation was individually selected for each sample to effect photobleaching.

Identification of pigments was based on the peak wavelength values found in the literature and by the use of spectral reference databases created in the Institute of Forensic Research, Krakow. The identification of pigments and sample differentiation were carried out on row spectra, that is, without smoothing.

Results

Identification of Pigments

Six types of pigments have been found in the whole group of the examined paint samples: copper phthalocyanine (PB 15), rutile (PW 6), chrome yellow (PY 34), dioxazine violet (PV 23), indanthrone (PB 60), and chlorinated copper phthalocyanine (PG 7). One metallic paint contained carbon black pigment (PBL 7) (Table 2). Prussian blue (PB 27) was not found in any of the

examined samples, although some papers indicate its use in blue automotive paints (3,11).

The results obtained for solid and metallic blue paints with the use of all three lasers (514, 633, and 785 nm) are presented in Tables 3 and 4, respectively.

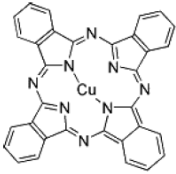
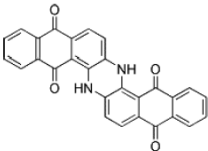
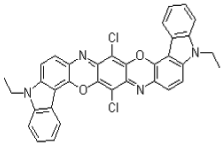
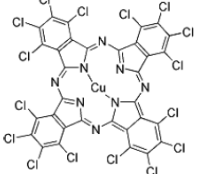
It was noticed that in most cases, one or two kinds of pigments were included in paint although a mixture of three or four pigments was also found. The pigments were identified on the basis of spectra obtained using one or more excitation lasers. For example, using the 514 nm laser, it was possible to identify two main pigments, that is, PV 23 and PB 15, in solid paint no. 19, whereas the application of other lasers did not provide detection of other pigments in that paint sample (Table 3). However, the measurement of Raman spectra excited with 633 and 785 nm laser wavelengths allowed us to confirm the presence of both pigments detected and identified previously by the use of the 514 nm laser.

On the basis of spectra measured using two lasers, it was often possible to identify more pigments, for example, three pigments in solid color paint sample no. 15: PB 15, PW 6, and PG 7 or four pigments, that is, PB 15, PY 34, PW 6, and PG 7, in solid paint no. 1 (Fig. 1). In metallic paint sample no. 22, the presence of three organic pigments, that is, PB 15, PV 23, and PB 60, was detected.

Evaluation of Usefulness of Raman Spectroscopy

The best excitation laser source providing information on pigment content was the 785-nm laser line, while the 514 nm laser induced fluorescence for more than half of the samples, masking all the spectral information. Only in one metallic paint sample (no. 16) was no pigment identified because of the fluorescence observed at all the applied excitation laser wavelengths. When using the 785 nm laser, the fluorescence was either weak or absent for the majority of the samples. Raman spectra excited by all lasers were capable of identifying the

TABLE 2—Pigments identified in examined samples.

Pigment C.I. Name	Pigment Chemical Name	Chemical Composition	Raman Characteristic Bands per cm
PW 6	Titanium white	TiO ₂ (rutile form)	455, 610
PY 34	Chrome yellow	PbCrO ₄	358, 376, 402, 840
PB 15	Copper phthalocyanine		590, 680, 748, 1341, 1452, 1529
PB 60	Indanthrone		1282, 1300, 1330, 1355, 1382, 1617
PV 23	Dioxazine violet		1345, 1391, 1430
PG 7	Polychlorinated copper phthalocyanine		685, 740, 776, 817, 1280, 1337, 1536
PBK7	Carbon black		1325, 1580

pigments in 23 samples (spectra obtained for sample no. 6 are shown as an example in Fig. 2), but for 12 samples, spectra were obtained only by using a selected laser. In some cases, some weak peaks hidden by the fluorescence background were observed, which suggest the presence of a pigment. Application of another laser made it possible to identify pigments in the examined sample (Fig. 3).

In the majority of samples, almost 100% elimination of fluorescence was obtained using the photobleaching method, and the spectra were of a very good quality with clearly visible bands originating from pigments. In some cases, the elimination of fluorescence was only partial. Nevertheless, the main bands of pigments were visible as small peaks. So, in spite of some fluorescence, it was possible to obtain spectra enabling us to identify some pigments present in the sample. The effect of the applied procedure on solid paint no. 12 and no. 14 is shown as an example (Fig. 4 *a,b*). Fluorescence was observed in the top spectrum, while in the bottom spectrum—obtained after addi-

tional irradiation (photobleaching) of the sample—peaks belonging to pigments occurred enabling us to identify two of them, that is, dioxazine violet (PV 23) (1345, 1390, 1430 per cm) and copper phthalocyanine (PB 15) (680, 1340, 1449, 1524 per cm) in sample no. 12 and rutile (PW 6) (455, 610 per cm) and copper phthalocyanine (PB 15) in sample no. 14.

It was observed that some pigments were more common for metallic paints and others for solid color ones. However, it seems that the same set of pigments was used in both of the examined types of paints. Only ratios of their concentrations were different. The majority of solid color blue paints contained PB 15 or a mixture of PB 15 and PV 23 (Fig. 5*a*). In metallic blue paints, a larger variety of the pigments was observed (Fig. 5*b*). The largest group (nine samples) contained a mixture of PB 15 and PV 23. In four samples, only PB 15 was detected. PB 60 alone or in a mixture with PB 15, PV 23, or PG 7 was identified in 19 samples of metallic paints, while pigment PB 60 was identified only in one solid color paint sample (Fig. 6).

TABLE 3—Results obtained for solid color paints.

Sample	Laser Wavelength		
	514 nm	633 nm	785 nm
1	PB 15, PW 6, PY 34	PB 15, PG 7	PB 15, PG 7
2	PV 23, PB 15	Fluorescence, PB 15	PB 15
3	Fluorescence	PB 15	PB 15
4	Fluorescence	Fluorescence	PB 15
5	Fluorescence	PB 15	PB 15
6	PV 23, PB 15	PV 23, PB 15	PV 23, PB 15
7	PV 23, PB 15	Fluorescence, PV 23, PB 15	PV 23, PB 15
8	Fluorescence	Fluorescence, PB 15	PB 15
9	PV 23, PB 15	Fluorescence, PV 23, PB 15	PV 23, PB 15
10	PV 23, PB 15	Fluorescence	PV 23, PB 15
11	PV 23	Fluorescence, PV 23, PB 15	PV 23, PB 15
12	Fluorescence	PB 15	PB 15, PV 23
13	PV 23, PB 15	Fluorescence	PB 15
14	Fluorescence	PB 15	PB 15, PW 6
15	PB 15, PW 6	PB 15, PG 7	PB 15, PG 7
16	Fluorescence	PB 15, PG 7	PB 15, PG 7
17	PV 23, PB 15	Fluorescence, PV 23, PB 15	PV 23, PB 15
18	Fluorescence, PV 23	PV 23, PB 15	PV 23, PB 15
19	PV 23, PB 15	PV 23, PB 15	PV 23, PB 15
20	PB 60	PB 60	PB 60
21	Fluorescence	Fluorescence, PB 15	PB 15
22	Fluorescence	Fluorescence	PB 15
23	PV 23, PB 15	Fluorescence	PB 15, PBL 7
24	Fluorescence	PB 15	PB 15
25	PV 23, PB 15	PV 23, PB 15	PB 15
26	PV 23, PB 15	Fluorescence, PV 23	PV 23, PB 15

Taking into account all the examined samples, it seems that copper phthalocyanine (PB15) is the main pigment responsible for the color of blue automotive paints. Other pigments are probably added to affect the shade of blue. Chlorinated copper phthalocyanine (PG 7) is responsible for the greenish shade, while a mixture of dioxazine violet (PV 23) or indanthrone (PB 60) with PB 15 allows production of a wide range of reddish shades of blue. Both mentioned pigments have similar color properties, so their simultaneous application in a paint was rare (four samples). Moreover, pigment PY 34 (chrome yellow) is added to produce a yellow shade of blue, that is, more greenish hue could be obtained.

Comparison of the Paint Samples

By comparing the Raman spectra obtained for various paint chips, it was possible to differentiate between samples. However, there were some samples exhibiting fluorescence, so their spectra did not provide any information about pigment content. The spectra of some samples were characterized by distinct visible bands originating from one dominating pigment. The main criterion for discrimination between paint samples on the basis of the spectra obtained was the type of pigment present in each sample. It was observed that in some cases, the general shape of the spectra was similar for several samples, but in the background of the bands of the main pigment, small peaks of minor components were visible. Their identification was often possible. So, further discrimination between samples was performed, taking into consideration small peaks visible in spectra which suggested the presence of other components in the sample.

Taking into consideration the pigment content of examined paints (Tables 2 and 3), it was found that there are nine pairs of

TABLE 4—Results obtained for metallic paints.

Sample	Laser Wavelength		
	514 nm	633 nm	785 nm
1	Fluorescence	PB 60, PB 15	PB 60, PB 15
2	Fluorescence	PB 60, PB 15	PB 60, PB 15
3	Fluorescence	Fluorescence	PB 15, fluorescence
4	Fluorescence	PB 60, PB 15	PB 60, PB 15
5	Fluorescence	PB 60, PB 15	PB 60
6	Fluorescence	PB 15	PB 15, fluorescence
7	Fluorescence	Fluorescence, carbon	Carbon black
8	Fluorescence	PB 15, PG 7	PG 7
9	Fluorescence	PB 15, fluorescence	PB 15
10	PV 23	Fluorescence	PB 15
11	PV 23	Fluorescence	PV 23, PB 15
12	Fluorescence	Fluorescence	Fluorescence, PB 15, PB 60
13	Fluorescence	Fluorescence, PB 60	Fluorescence PB 60
14	Fluorescence	PB 15	PB 15
15	Fluorescence	Fluorescence, PB 60	Fluorescence, PB 60
16	Fluorescence	Fluorescence	Fluorescence
17	PV 23	Fluorescence	Fluorescence
18	PV 23	Fluorescence	Fluorescence
19	Fluorescence	PB 60	Fluorescence, PB 60
20	Fluorescence	Fluorescence, PG 7	PG 7
21	PV 23	PV 23, PB 15	PB 15
22	PV 23, PB 15	PV 23, PB 15	PB 60, PB 15
23	PV 23, PB 15	PV 23, PB 15	PB 60, PB 15
24	PV 23	PV 23	PV 23, PB 15
25	Fluorescence	PB 60	PB 60
26	PB 60	PB 60, PB 15	PB 60
27	PV 23	PV 23	PB 60
28	PB 60	PB 60, PG 7	PB 60
29	Fluorescence, PV 23	PV 23, PB 15	PB 15
30	PV 23	PB 60	PB 60
31	PV 23, PB 15	PB 15	PB 15
32	PV 23	PV 23, PB 15	PV 23, PB 15
33	PV 23	PB 60	PB 60
34	PV 23, PB 15	PV 23, PB 15	PV 23, PB 15
35	PB 60	PB 15, PB 60	PB 60
36	PV 23	PV 23	PG 7
37	Fluorescence	PB 60	PB 60
38	PB 60	PB 15	PB 60
39	PV 23, PB 15	PV 23, PB 15	PB 15
40	PV 23	PB 60	PB 60

samples of solid paints and nine of metallic paints which could not be differentiated from the remaining samples in each group. The discriminating power calculated for solid paints equals 97% (Table 5). Decreasing fluorescence by using the photobleaching method enabled us to identify pigments present in a given sample exhibiting fluorescence; however, it made the sample similar to other samples containing similar pigment content. So, the number of undifferentiated samples did not change and the discriminating power equaled 97%. Better discrimination was observed in the group of metallic paints, DP = 99%. In spite of the presence of the same main pigment in many paints, it was possible to discriminate between spectra on the basis of additional peaks and so to discriminate between the examined samples.

Conclusions

It was found that the majority of the obtained Raman spectra provide information about the main pigments present in the sample. The combination of two or three excitation lasers allowed the detection of a mixture of pigments present in the examined paint samples. The 785-nm laser line seems to be

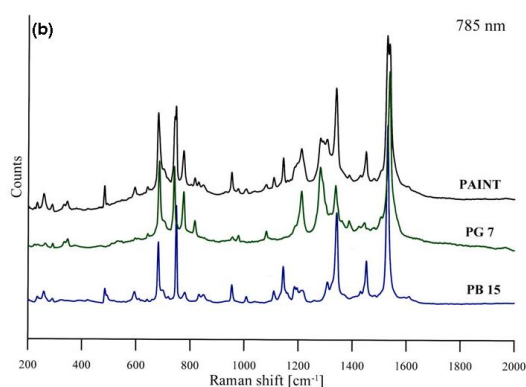
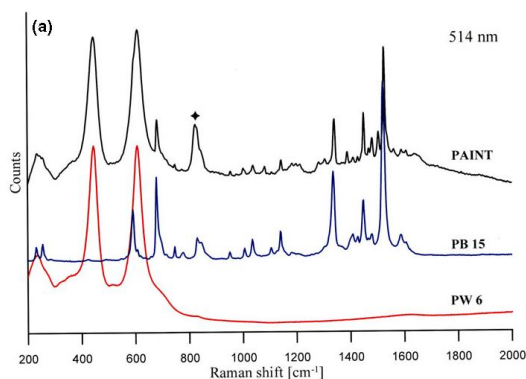


FIG. 1—Raman spectra of sample no. 1 and identified pigments: (a) PB 15, PW 6, and PY 34 (♦ band 840/cm)—using 514 nm laser. (b) PB 15, PG 7—using 785 nm laser.

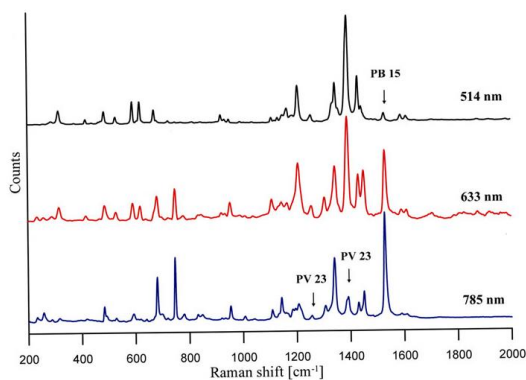


FIG. 2—Raman spectra of solid color paint no. 6 with marked pigments: at 514 nm laser wavelength—main bands originate from PV 23, small bands point at the presence of PB 15 (marked by arrow) at 633 nm laser wavelength—bands originated from both, PV 23 and PB 15 are visible at 785 nm laser wavelength—main bands originate from PB 15, small bands point at the presence of PV 23 (marked by arrows).

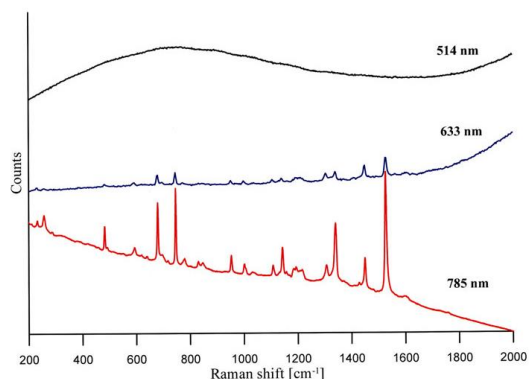


FIG. 3—Raman spectra of solid color paint no. 21: at 785 and 633 nm laser wavelengths—visible bands originate from PB 15 at 514 nm laser wavelength only fluorescence is visible.

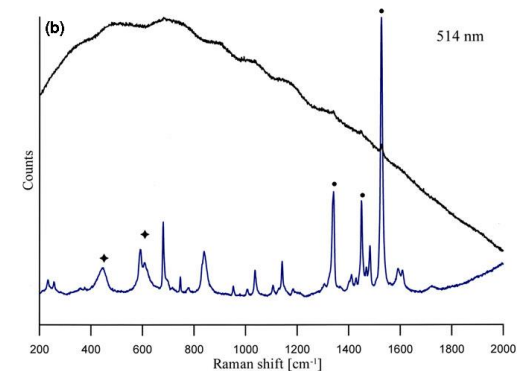
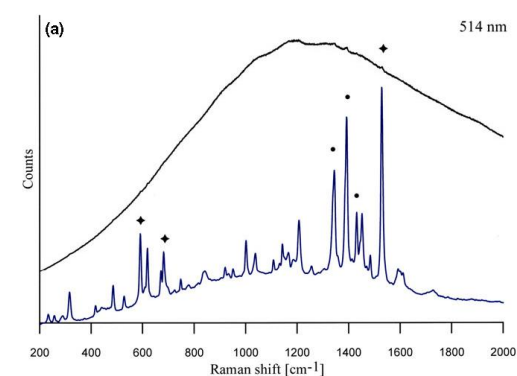


FIG. 4—Raman spectra of paint samples without (on the top) and with application of photobleaching method (on the bottom): (a) solid paint sample no. 12—there is on the top spectrum fluorescence; on the bottom spectrum bands originated from PB 15 and PV 23 are visible. (♦)—characteristic bands of PB 15 pigment. (●)—characteristic bands of PV 23 pigment. (b) solid paint sample no. 14—there is on the top spectrum fluorescence; on the bottom spectrum bands originated from PB 15 and PV 23 are visible. (♦)—bands of PV 6. (●)—bands of PB 15.

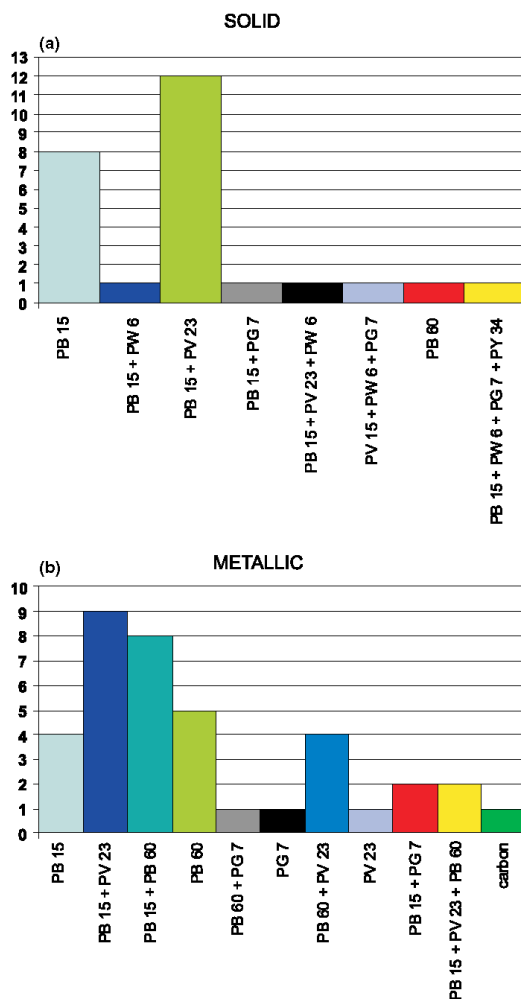


FIG. 5—Pigments found in the whole set of (a) solid color paints (b) metallic paints.

the best one in the comparison of blue car paints, whereas the 514 and 633 nm laser induced fluorescence in many samples.

It was noticed that fluorescence of the sample could be reduced using the photobleaching method, which makes it possible to see and identify the bands of pigments. The main criterion for discrimination between paint samples on the basis of the obtained spectra was the type of pigments present in each paint sample. If the samples did not differ with respect of the main pigment, further differentiation was possible on the basis of small peaks belonging to minor components (pigments) of the paint. The estimated discrimination power ranged from 97% for solid color paint samples to 99% for metallic paint samples. Photobleaching did not change the discrimination power for the solid paints. On the other hand, by taking into consideration

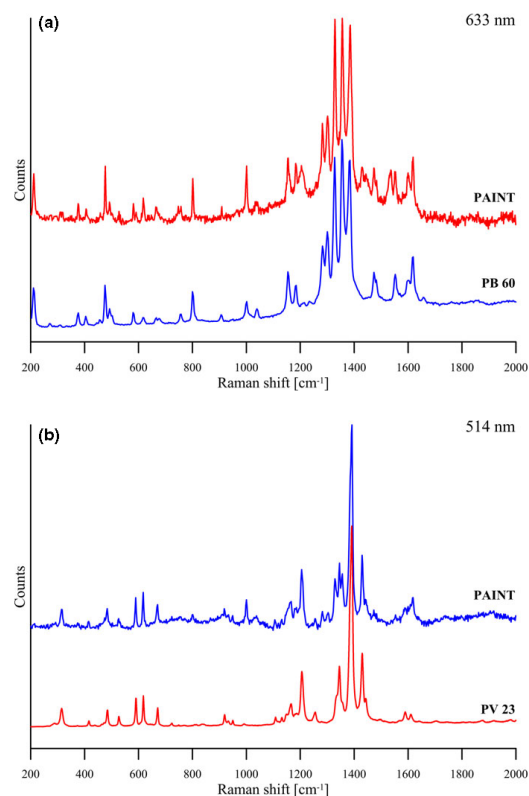


FIG. 6—Raman spectra of metallic paint no. 40 (a) at 785 nm laser wavelength—visible bands originate from PB 60, (b) at 514 nm laser wavelength—visible bands originate from PV 23.

TABLE 5—Results of discrimination analysis.

Sample Group	Solid Paints	Metallic Paints
Number of samples in groups	26	40
Number of pairs of samples in groups	325	780
Number of sample pairs	316	771
differentiated without photobleaching		
Discrimination power without	97%	99%
photobleaching		

small peaks visible in spectra, discrimination power increased significantly.

References

1. Beveridge A, Fung T, MacDougall D. Use of infrared spectroscopy for characterization of paint fragments. In: Caddy B, editor. Forensic examination of glass and paints. London, U.K. and New York, NY: Taylor & Francis, 2001;183–241.
2. Suzuki EM. Infrared spectra of U.S. automobile original topcoats. II Identification of some topcoat inorganic pigments using an extended range (4000–220 cm^{-1}) Fourier transform spectrometer. J Forensic Sci 1996;41:393–406.
3. Ryland SG, Jergovich TA, Kirkbride KP. Current trends in forensic paint examination. Forensic Sci Rev 2006;18:98–117.

4. Cousins DR, Platoni CR, Russell LW. The use of MSP for the identification of pigments in small paint samples. *Forensic Sci Int* 1984;24:183–96.
5. Voskertchian GP. Quantitative analysis of organic pigments in forensic paint examination. *J Forensic Sci* 1995;40(5):823–5.
6. Bartick EG, Buzzini P. Raman spectroscopy in forensic science. In: Meyers RA, editor. *Encyclopedia of analytical chemistry*. Chichester, U.K.: John Wiley & Sons Ltd, 2009;1–10.
7. Bell IM, Clark RIH, Gibbs PJ. Raman spectroscopic library of natural and synthetic pigments. *Spectrochim Acta* 1997;53A:2159–79.
8. Franquelo ML, Duran A, Herrera LK, Jimenez de Haro NC, Perez-Rodriguez JL. Comparison between micro-Raman and micro-FTIR spectroscopy techniques for the characterization of pigments from southern Spain cultural heritage. *J Mol Struct* 2009;924–926:404–12.
9. de Gelder J, Vandenabeele P, Govaert F, Moens L. Forensic analysis of automotive paints by Raman spectroscopy. *J Raman Spectrosc* 2005;36:1059–67.
10. Kuptsov AH. Application of Fourier transform Raman spectroscopy in forensic science. *J Forensic Sci* 1994;39:305–18.
11. Suzuki EM, Carrabba M. *In situ* identification and analysis of automotive paint pigments using line segment excitation Raman spectroscopy. *J Forensic Sci* 2001;46:1053–69.
12. Skenderovska M, Minčeva-Šukarova B, Andreeva L. Application of micro-Raman and FT-IR spectroscopy in forensic analysis of automotive topcoats in the republic of Macedonia. *Maced J Chem Chem Eng* 2008;27(1):9–17.
13. Bell SEJ, Fiido LA, Speers SJ, Armstrong WJ. A rapid forensic analysis and identification of "Lilac" architectural finishes using Raman spectroscopy. *Appl Spectrosc* 2005;59(1):100–8.
14. Heitzman S. Indanthrone pigments for polymers and coatings. *Polym Paint Col J* 2011;201(4562):24–7.
15. Thompson B. Shades of blue. *Polym Paint Col J* 2009;199(4542):31–2.
16. Gregory P. Industrial applications of phthalocyanines. *J Porphyrins Phthalocyanines* 2000;4(4):432–7.
17. Zieba-Palus J, Michalska A, Weselucha-Birczyńska A. Characterisation of paint samples by infrared and Raman spectroscopy for criminalistic purposes. *J Mol Structure* 2011;993:134–41.
18. Govaert F, Bernard M. Discriminating red spray paints by optical microscopy, Fourier transform infrared spectroscopy and X-ray fluorescence. *Forensic Sci Int* 2004;140:61–70.
19. Massonnet G, Stoecklein W. Identification of organic pigments in coatings: applications to red automotive topcoats. Part III. Raman Spectroscopy. *Sci Justice* 1999;39:181–7.
20. Zieba-Palus J, Was-Gubala J. An investigation into the use of micro-Raman spectroscopy for the analysis of car paints and single textile fibre. *J Mol Struct* 2011;993:127–33.
21. Buzzini P, Massonnet G. A market study of green paints by FTIR and Raman spectroscopy. *Sci Justice* 2004;3:123–31.
22. Claybourne M, Agbenyega JK, Hendra PJ, Ellis G. Fourier transform Raman spectroscopy in the study of paints. *Adv Chem Ser* 1993;236:443–82.
23. Ellis G, Claybourne M, Richards SE. The application of Fourier transform Raman spectroscopy to the study of paint systems. *Spectrochim Acta A* 1990;46(2):227–34.

Additional information and reprint requests:
Janina Zieba-Palus, Ph.D.
Institute of Forensic Research
Westerplatte 9
31-033 Krakow
Poland
E-mail: jzieba@ies.krakow.pl

INSTYTUT EKSPERTYZ SĄDOWYCH

im. Prof. dra Jana Sehna

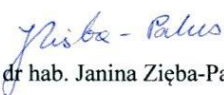
PL 31-033 Kraków, ul. Westerplatte 9
tel. (+48 12) 61 85 700, fax (+48 12) 422 38 50
e-mail: ics@ics.krakow.pl

Kraków, dnia 23 sierpnia 2017 r.

Oświadczenie

Oświadczam, iż w publikacji *Characterisation of blue pigments used in automotive paints by Raman spectroscopy* opublikowanej w Journal of Forensic Sciences 2014 (59) 943-949 mój udział polegał na:

- merytorycznym nadzorze w określeniu ogólnej koncepcji badań,
- merytorycznym nadzorze nad interpretacją wyników badań,
- tworzeniu manuskryptu i odpowiedzi na recenzje,
- przeprowadzeniu procedury redakcyjnej.


prof. dr hab. Janina Zięba-Palus
Instytut Ekspertyz Sądowych
im. Prof. dra Jana Sehna w Krakowie
ul. Westerplatte 9, 31-033 Kraków

INSTYTUT EKSPERTYZ SĄDOWYCH

im. Prof. dra Jana Sehna

PL 31-033 Kraków, ul. Westerplatte 9
tel. (+48 12) 61 85 700, fax (+48 12) 422 38 50
e-mail: ies@ies.krakow.pl

Kraków, dnia 23 sierpnia 2017 r.

Oświadczenie

Oświadczam, iż w publikacji *Characterisation of blue pigments used in automotive paints by Raman spectroscopy* opublikowanej w Journal of Forensic Sciences 2014 (59) 943-949 mój udział polegał na:

- ustaleniu ogólnej koncepcji badań,
- sformułowaniu hipotezy badawczej,
- przeprowadzeniu analiz lakierów samochodowych z wykorzystaniem spektrometrii ramanowskiej,
- identyfikacji pigmentów obecnych w próbkach na podstawie uzyskanych widm Ramana,
- interpretacji wyników związanych z wizualnym porównaniem widm,
- współudziale w tworzeniu publikacji i formułowaniu odpowiedzi na recenzje.

Aleksandra Michalska

Instytut Ekspertyz Sądowych
im. Prof. dra Jana Sehna w Krakowie
ul. Westerplatte 9, 31-033 Kraków

Publikacja 2

Tytuł:	Photobleaching as an useful technique in reducing of fluorescence in Raman spectra of blue automobile paint samples
Autorzy:	Zięba-Palus J., Michalska A.
Czasopismo:	<i>Vibrational Spectroscopy</i>
Wartość <i>Impact Factor</i> :	2,003
Punkty MNiSW:	25
Cytowana w rozprawie jako:	Zięba-Palus i Michalska 2014b



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Vibrational Spectroscopy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vibspec

Photobleaching as a useful technique in reducing of fluorescence in Raman spectra of blue automobile paint samples

Janina Zięba-Palus*, Aleksandra Michalska

Institute of Forensic Research, Westerplatte 9, 31-033 Krakow, Poland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 December 2013

Received in revised form 30 June 2014

Accepted 30 June 2014

Available online 8 July 2014

Keywords:

Raman microspectroscopy

Car paints

Photobleaching

Pigment identification

Forensic examination

ABSTRACT

The usefulness of the photo-beaching technique in reducing the fluorescence background in Raman spectra of automotive paints was studied. The method was applied to group of 20 blue solid and metallic paints, in which pigment identification with the use of a green laser (514.5 nm) was not possible due to strong fluorescence. The samples were irradiated by high laser power for a long period of time before acquiring spectra. The process of bleaching was studied in detail based on two samples. Then the procedure was applied to all samples before acquiring spectra. Due to irradiation fluorescence originating from the background decreased, whereas Raman scattering features of samples stayed unchanged. The applied procedure satisfactorily quenched fluorescence in 90% of examined samples and made pigment identification possible.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The forensic examination of automotive paint chips found at a car accident site often includes comparison with paint originating from the suspect's vehicle. Several analytical techniques are used to characterise paint traces [1,2]. Optical microscopy methods are usually performed to establish the morphology of a trace, whereas microspectroscopic methods are used to provide information about its colour and chemical composition. IR spectroscopy readily detects the binder type as well as some inorganic pigments and extenders and Raman spectroscopy has been shown to be a useful tool in detection and identification of many organic pigments [1–6] present in a paint trace. Pyrolysis gas chromatography coupled to mass spectrometry is used to identify binder subclasses more precisely [1].

Raman spectroscopy usually enables one to detect compounds at very low concentrations in the presence of other less scattering non-pigment components. Its non-destructive nature makes it possible to examine very small particles or samples with a diameter of less than 10 µm without any special sample preparation for analysis, and regardless of the form of the sample. Raman spectroscopy has been successfully applied in the examination of automotive paints [6–10]. The usefulness of the technique in the identification of inorganic pigments and resins for forensic purposes has

been demonstrated by Kuptsov [11], Bartick [12] and Suzuki et al. [13]. Characterisation of pigment distribution in a cross-section of automotive paint by the use of the Raman mapping technique has also been carried out [9]. So far, Raman spectroscopy has also been applied as a complementary technique to infrared spectroscopy in studies of spray paints [15] and automotive paints [14,16] available on the market.

However, Raman spectroscopy also has same limitations. One of them is the occurrence of fluorescence, which precludes pigment identification. Raman scattering is a relatively weak phenomenon and for many samples it can be masked by more intense fluorescence effects. To overcome this difficulty, some authors proposed application of the Fourier transform Raman technique, which uses a near-infrared excitation laser [11,14]. Other authors suggested the use of several excitation laser sources in measurements of paint samples for the same purpose [8,10,12]. As automotive paint samples could include a mixture of as many as three or four pigments, of which some can only be detected by using an appropriate laser wavelength [10], this approach seems to be essential. A method based on baseline correction could be applied in a case where fluorescence is low and only causes an increase in background [17]. However, special attention should be paid to avoid changes in the original spectrum, such as creating extra peaks.

The photobleaching method is another approach, which seems to be effective in removing or partially quenching a fluorescence background. The method is based on constant sample irradiation for a long period of time before acquiring a spectrum. The light source for the photobleaching is simply the Raman spectrometer's

* Corresponding author. Tel.: +48 12 6185765; fax: +48 12 4223850.
E-mail address: jziba@ies.krakow.pl (J. Zięba-Palus).

laser. Due to this irradiation, the fluorescence originating from the background decreases, whereas Raman scattering features from samples should stay unchanged. In many cases, the molecule causing the fluorescence is an “impurity” in the main sample. Photobleaching “modifies” the sample by effectively removing the low level contaminant and leaving the species of interest unchanged. In this pre-treatment method, there is no need to change laser wavelength, which is another advantage of this process. However, the application of two slightly different laser wavelengths, one in the photobleaching pre-treatment and another in the recording of Raman data, is also possible [18].

Until now, the usefulness of photobleaching has been reported in detail in the analysis of biological samples like human skin [18,19] and bones [20], as well as in examination of lithium hydride corrosion [21] or in pigment identification on painted textiles [22]. The application of the photobleaching procedure in paint examination was also mentioned by Buzzini et al. [7], who obtained informative spectra from two red fluorescence paints, which were further compared to solve a hit-and-run case. Other authors [17] mentioned that “bleaching” was carried out in paints where strong fluorescence occurred. However, no detailed information about the way of analysis or number of examined samples was included.

Moreover, some examiners [20–22] have suggested that photobleaching may cause same changes in Raman spectra. Prolonged irradiation or application of too high laser power can burn a sample, making changes in its surface chemistry [21], and in some cases alter the mineral to matrix band area ratio [20], or decrease same of the relative peak heights [22]. However, it has been ascertained that photobleaching can help in the identification of selected compounds by breaking down the fluorescent molecules and reducing the fluorescence background.

The aim of the present study was to demonstrate the usefulness of photobleaching as a pre-treatment method, for quenching fluorescence in Raman spectra of automotive paints. The repeatability of the results obtained using the applied pre-treatment method and the influence of several parameters like duration of irradiation and laser power were also checked.

The study focused on blue automotive paints, both solid and metallic, for which pigment identification using a green laser (514.5 nm) was not possible due to strong fluorescence. The pigment composition of examined samples was well known to the authors [10]. All pigments present in the examined samples were chemically stable and showed good light fastness [23,24]. Therefore it was predicted that they should not alter when photobleached. Moreover, spectra of pure pigments obtained using a green laser (514.5 nm) were of good quality, whereas spectra of blue automotive paints recorded for this laser usually suffer from fluorescence, which points to the influence of other paint components.

2. Materials and methods

2.1. Samples

Fragments of 20 solid and metallic blue car paints of different shades originating from bodies of damaged cars were examined (Table 1). Their colours and shades originated from organic pigments like: copper phthalocyanine – Pigment Blue 15 (Colour Index C.I. 74250), indanthrone – Pigment Blue 60 (C.I. 69800), dioxazine violet – Pigment Violet 23 (C.I. 51319) or chlorinated copper phthalocyanine (C.I. 74260) commonly known as a Pigment Green 7. The Raman spectra of the examined samples obtained using a 514.5 nm excitation line were characterised only by fluorescence, or fluorescence dominated in their spectra making pigment identification impossible.

Table 1
Car manufacturer.

No.	Paint type	Car
1	Solid	Lada
2		Fiat Seicento
3		Fiat 126p
4		Fiat 125p
5		Lada
6		VW
7		Lada
8		Citroen
9		Polonez
10		Polonez
11	Metallic	Ford Sierra
12		Fiat 126p
13		Fiat 126p
14		Citroen
15		Toyota Camry
16		Citroen
17		Volvo
18		Kia
19		Renault Clio RN
20		Nissan

2.2. Raman microspectroscopy

Raman spectra were obtained using a Renishaw inVia spectrometer equipped with a confocal Leica microscope and excitation sources. An Argon ion laser (514.5 nm) was used in the experiments. The laser beam was focused on samples by a 50× (N.A = 0.75) objective lens, which gives a theoretical spot size of approximately 2 μm. The light was dispersed by a diffraction grating with 2400 grooves/mm. The signal was recorded using a Peltier-cooled charged coupled device (CCD). Spectral data were processed with Renishaw Wire 3.2 software. After photobleaching pre-treatment spectra of all samples were recorded in situ in the reflection mode from the surface in the 200–2500 cm⁻¹ region with an acquisition time of 10 s and collection of five accumulations. Each paint sample was measured three times at different spots to check its homogeneity. The laser power applied while recording Raman spectra was 1% or 5% of its maximum power (150 mW). All the presented spectra were neither baseline corrected, nor smoothed.

2.3. Photobleaching procedure

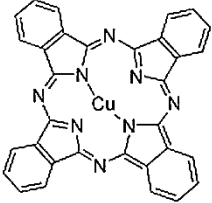
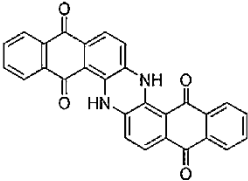
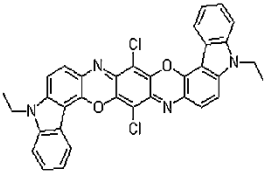
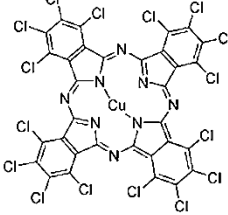
The influence of laser power (LP) and duration of irradiation on the quality of obtained Raman spectra of paint sample were checked. To achieve this goal, two paint samples – one solid (no. 3) and one metallic (no. 14) – were irradiated in sequence by three different values of laser power. During irradiation of sample no. 3, laser power of 50%, 10% and 5% was used, whereas for metallic paint no. 14 – 100%, 50% and 10% of laser power was applied. Irradiations using selected laser power values were performed on the same point of a sample for a period of time equal to 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 75, 90, 120, 150 and finally 210 min. After each photobleaching pre-treatment, a single Raman scan was recorded. The measurements were performed in the same conditions for each sample. To evaluate the reproducibility of the pre-treatment procedure, sample no. 3 was irradiated by 10% of laser power, applying the same irradiation sequence three times at different points on the same sample.

In order to evaluate the durability of quenching fluorescence, sample no. 3 was irradiated for 30 min by 10% of laser power and then a Raman spectrum was measured. After data collection, the sample was left in the sample chamber without changing its position till the next day and then measured again.

The influence of sample irradiation on the quality of Raman spectra was analysed.

Table 2

Pigments identified in examined samples.

Pigment C.I. name	Pigment chemical name	Chemical composition	Characteristic bands (cm ⁻¹)
PW6	Titanium white	TiO ₂ (rutile form)	455, 609
PB15	Copper phthalocyanine		680, 1340, 1450, 1529
PB60	Indathrone		1282, 1303, 1330, 1355, 1385
PV23	Dioxazine violet		590, 1345, 1391, 1430
PG7	Polychlorinated copper phthalocyanine		685, 1078, 1280, 1385, 1500

Next, photobleaching pre-treatment was applied to all 20 samples. Each paint sample was irradiated by 100%, 50% or 10% of maximum laser power for 5 min. The surface of the irradiated sample was carefully observed. When thermal changes such as burning or tarnish were noticed, the analysed place (spot) was changed and the procedure repeated at lower LP until satisfactory quality of a spectrum was recorded or until the moment when further irradiation of paint did not improve the spectrum. Therefore, the laser power and the time of irradiation were set for each sample individually.

If fluorescence was satisfactorily quenched, pigment identification was carried out. It was based on the presence of characteristic peaks of pigments (Table 2) originated from reference database previously created in the Institute of Forensic Research in Krakow.

3. Results and discussion

3.1. Photobleaching procedure and performed experiments

Fig. 1 presents the reduction in fluorescence background for blue paint no. 3 when irradiated under a wavelength of 514.5 nm at various intensities of irradiation: 5% (rhombuses in Fig. 1), 10%

(squares in Fig. 1) and for 50% of maximum laser power (triangles in Fig. 1). The fluorescence background was understood as the area under the Raman baseline in the region of 1290–1310 nm, which corresponded to the part of the Raman spectrum where no bands from compounds were observed. The rate of reduction in fluorescence background was calculated as the ratio of this area from the spectrum (under the Raman baseline in the region of 1290–1310 nm) recorded after irradiation to the value of the corresponding area originating from the Raman spectrum of the paint before application of the bleaching process. The rate of reduction of fluorescence background was also calculated for a few other ranges of the spectrum, where no bands were observed. However, the obtained results were analogous.

It is clearly visible that the fluorescence background decreased approximately exponentially with time and the rate of reduction of fluorescence depended on the applied laser power. The stronger the laser power used, the faster the reduction of the background has been achieved. It seems that for more fragile samples, where a high laser power cannot be applied due to thermal degradation problems, similar results can be obtained using lower laser power and a longer period of time (duration). Results obtained for metallic paint no. 14 confirmed the correlation between the applied laser

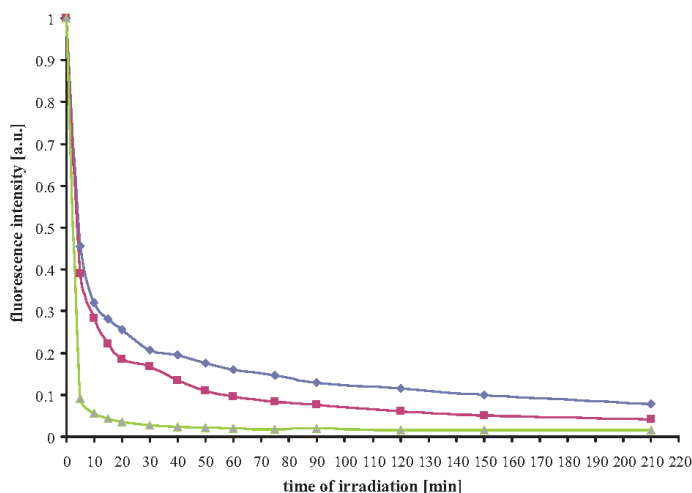


Fig. 1. The rate of reduction of fluorescence background for paint no. 3 when irradiated under a wavelength of 514.5 nm at various intensity of irradiation: 5% (rhombus), 10% (squares) and 50% (triangles); maximum laser power (150 mW).

Table 3

Reproducibility of photobleaching pre-treatment checked for irradiation of sample no. 3 under a wavelength of 514.5 nm at 10% laser power and different time of irradiations.

No	Time of irradiation of the same point of the sample													
	5 min	10 min	15 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min	75 min	90 min	120 min	150 min	210 min	
1	0.467	0.283	0.277	0.247	0.197	0.172	0.153	0.137	0.110	0.096	0.077	0.067	0.050	
2	0.431	0.327	0.264	0.231	0.191	0.166	0.144	0.126	0.111	0.099	0.078	0.067	0.052	
3	0.462	0.347	0.292	0.248	0.201	0.164	0.141	0.124	0.114	0.102	0.090	0.078	0.061	
Mean	0.453	0.319	0.278	0.242	0.197	0.168	0.146	0.129	0.112	0.099	0.082	0.071	0.054	
SD	0.019	0.033	0.014	0.010	0.005	0.004	0.006	0.007	0.002	0.003	0.007	0.007	0.006	
RSD (%)	4.243	10.223	5.072	4.050	2.584	2.485	4.396	5.715	1.950	3.042	8.790	9.618	10.381	

power and time of irradiation, although the rate of reduction of fluorescence background gained for the same period of irradiation was different.

It was observed that the rate of quenching fluorescence background in solid paint no. 3 is rather repeatable (Table 3). Most results (rates of reduction of fluorescence background calculated in the region of 1290–1310 nm) corresponding to a particular time of irradiation did not differ significantly: the calculated relative standard deviation did not exceed 10.4%, and mostly the RSD value was even smaller. Nevertheless, the repeatability of the photobleaching pre-treatment was only checked on the one (above) example due to the time-consuming nature of the process. Therefore for a general view, the process should be further studied.

It was found that laser interaction during the bleaching process quenched fluorescence permanently. The rate of reduction of the fluorescence background in the Raman spectrum of the paint no. 3 recorded immediately after the bleaching process and the day after pre-treatment did not change and peaks originating from pigments still remained visible (Fig. 2).

Turning now to any possible detrimental influences of the bleaching process on the recorded Raman spectra – in the case of these two paints, prolonged irradiation did not caused changes in their Raman spectra, i.e. changes in peak positions with respect to peak positions in pigments alone, as well as in comparison to other not-irradiated paints containing the same pigments. No broadening of peaks or any changes in general shape of these peaks associated with pigments were observed either. Therefore, a photobleaching pre-treatment was applied to the rest of samples.

3.2. Raman microspectroscopy measurements

It was found that two groups of paint samples – solid and metallic – required different laser power during the bleaching process. In the case of metallic paints, 100% or 50% of laser power could be applied, whereas for solid paints – in the majority of cases – the

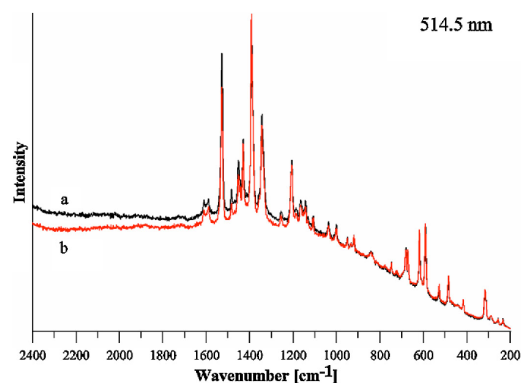


Fig. 2. Raman spectra of paint no. 3 collected (a) directly after photobleaching – 30 min of irradiation at 10% laser power (b) 24 h later.

10

J. Zięba-Palus, A. Michalska / Vibrational Spectroscopy 74 (2014) 6–12

Table 4

Pigment identification – results obtained without photobleaching pre-treatment and after application of this procedure, by the use of green laser with wavelength of 514.5 nm.

No.	Pigment identification	Measurement after photo-bleaching pre-treatment
Standard conditions		
Solid paints		
1	Only fluorescence	PB15, PG7
2	Only fluorescence	Fluorescence, PB15
3	Only fluorescence	PB15, PV23
4	Only fluorescence	PB15, PW6
5	Only fluorescence	PB15
6	Only fluorescence	PB15
7	Strong fluorescence (visible only very weak bands, e.g. 680, 1341, 1452, 1529 nm from PB 15)	PB15, PW6
8	Fluorescence (visible only very weak bands, e.g. 680, 1529)	PB15, PG7, PW6
9	Only fluorescence	PB15
10	Fluorescence (very weak band 1529 nm)	PB15
Metallic paints		
11	Only fluorescence	PB 60
12	Only fluorescence	PB60, PB15
13	Only fluorescence	PB60, PB15
14	Only fluorescence	PB15
15	Only fluorescence	PB15
16	Only fluorescence	PB15
17	Only fluorescence	PB60, PB15
18	Only fluorescence	Fluorescence
19	Only fluorescence	PB60
20	Only fluorescence	Fluorescence

most suitable value of laser power was 10%. The application of laser power stronger than 10% caused thermal damage, as observed in 40% of solid samples. If no changes on the surface of paints were observed, the irradiation did not cause changes in Raman spectra recorded directly after photobleaching.

The results of photobleaching pre-treatment applied to all the examined paint samples are shown in Table 4. Irradiation of a sample before acquiring spectra allowed quenching or partial reduction of fluorescence background in 90% of samples. The applied procedure minimised fluorescence background and enabled us to reveal bands belonging to pigments. In most paints, almost all peaks originating from particular pigments become visible. In the case of solid paint no. 2 fluorescence was only partially quenched and just four weak bands, i.e. 680, 1340, 1450 and 1529 cm^{-1} were revealed. Bearing in mind the type of pigments that are present in blue automotive paints [10] and taking into account the fact that the visible weak bands corresponded to the most intensive bands of pigment PB 15 as well as that no bands of other pigments were seen in this region, this particular pigment could be identified. In the case of two metallic paints, i.e. no. 18 and 20 reduction of the fluorescence background was small and pigment identification was not possible.

A possible reason of the phenomenon of fluorescent background quenching is photolytic decomposition and breaking down of the fluorescence molecules that are present as an impurity or contaminants in samples. Their decomposition under prolonged irradiations caused reduction of the fluorescence background and so bands of pigments which were previously masked by a more intense fluorescence effect become visible. Automotive paint samples are complex mixtures of many compounds. Besides pigments, other components like binders, extenders or additives are present. So it is possible that the fluorescence observed in Raman spectra of paints originates from others paint components which were not identified by the Raman technique. Anyway, photobleaching

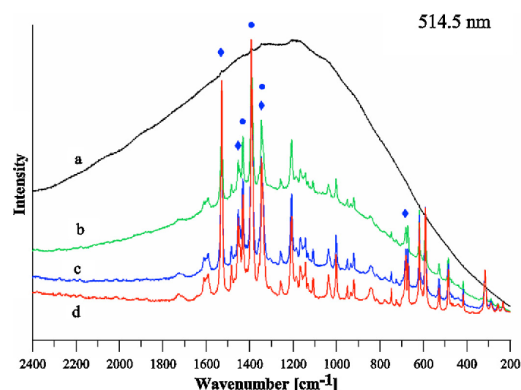


Fig. 3. Raman spectra of solid paint no. 3 collected (a) without applying photobleaching pre-treatment (only fluorescence visible), and after quenching of fluorescence by irradiation of paint for (b) 5 min, (c) 10 min and (d) 30 min at 100% of laser power. Rhombuses relate to bands of PB 15 pigment while circles relate to bands of PV 23.

decreases the fluorescence background but does not change pigments, so they can be identified.

A typical way of improving a spectrum during the photobleaching process is presented on the basis of two samples from each group (Figs. 3–7).

Fig. 3 shows spectra of blue solid paint no. 3 measured directly (without pre-treatment) and after quenching fluorescence by irradiation for 5, 10 and 30 min at 100% laser power. In the top spectrum (without irradiation-pre-treatment), only fluorescence can be observed, while in the spectrum obtained after 5 min irradiation of the paint sample, small peaks belonging to pigments are present. Further irradiation (10 min) provided a spectrum with clearly visible peaks of pigments, enabling us to identify two of them, i.e. dioxazine violet (PV 23) and copper phthalocyanine (PB 15) (Fig. 4).

Similarly, spectra of solid paint no. 1 obtained in normal measurement conditions (only fluorescence visible), and after quenching fluorescence by irradiation for 10, 20 and 40 min at 10% laser power are shown in Fig. 5. In the bottom spectrum (40 min of irradiation) no fluorescence could be observed and the clear peaks

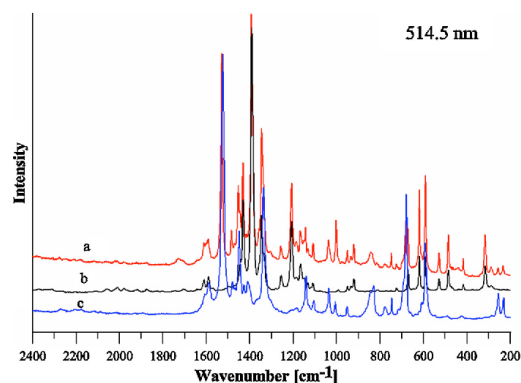


Fig. 4. Pigment identification performed for (a) solid paint no. 3 with references (b) PV 23 and (c) PB15.

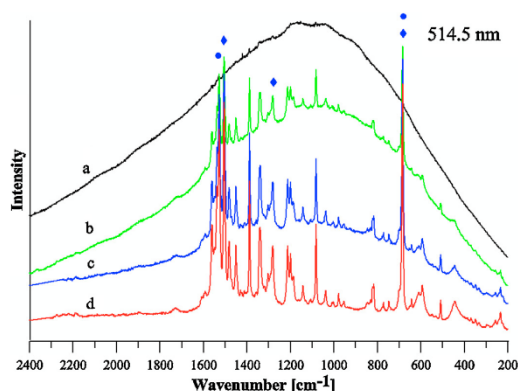


Fig. 5. Raman spectra of solid paint no. 1 collected (a) in normal measurement conditions (only fluorescence visible), and after quenching of fluorescence by irradiation of paint for (b) 10 min, (c) 20 min and (d) 40 min at 10% of laser power. Rhombuses relate to bands of PG 7 while circles relate to bands of PB 15.

were identified as originating from chlorinated copper phthalocyanine (PG 7) and copper phthalocyanine (PB 15).

Another example is shown in Fig. 6. Spectra of blue metallic paint (no. 12) in normal measurement conditions (only fluorescence visible), and after quenching fluorescence by irradiation for 40 and 70 min at 50% laser power are shown. It can be observed that after irradiation, fluorescence decreased; however, it is still visible in the spectra. Nevertheless, some peaks can be observed against the background of fluorescence and can be identified as originating from blue pigments copper phthalocyanine (PB 15) and indanthrone (PB 60).

In Fig. 7, spectra of blue metallic paint (no. 14) in normal measurement conditions (only fluorescence visible), and after quenching of fluorescence by irradiating paint for 30 and 60 min at 50% laser power are shown. In this case, fluorescence did not decrease. In the spectrum obtained after 60 min of irradiation, fluorescence is still visible; however, small peaks occur against this

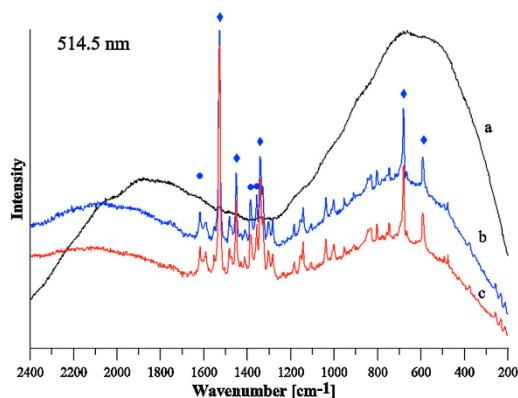


Fig. 6. Raman spectra of metallic paint no. 12 collected (a) in normal measurement conditions (only fluorescence visible), and quenching of fluorescence by irradiation of paint for (b) 40 min and (c) 70 min at 50% laser power. Rhombuses relate to bands of PB 15 while circles relate to bands of PB 60.

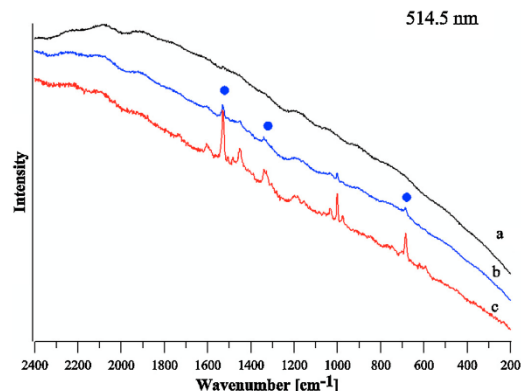


Fig. 7. Raman spectra of metallic paint no. 14 collected (a) without photobleaching pre-treatment (only fluorescence visible) and after paint irradiation for (b) 30 min and (c) 60 min at 50% laser power. Circles relate to revealed bands of PB 15.

background. The number and position of bands are the same as in the spectrum of PB15 pigment.

It was observed that the results of photobleaching pretreatment obtained for solid paints were better than for metallic ones. The reason could be the significant difference in the chemical composition of the two types of paint. The aluminium flakes in metallic paints – being like small mirrors – reflect a part of the incident radiation, causing a decrease in the Raman signal. The transparency of the basecoat in metallic paints in comparison to the opacity of the basecoat in solid ones might also have affected the results. Considering the results of photobleaching pre-treatment in these two groups of samples separately, it was noticed that the rate of quenching of the fluorescence was different in within each group. The influence of the clearcoat on the reduction of background in solid paints was not observed.

4. Conclusions

Raman analysis of blue automotive paints with the use of a green laser (514.5 nm) as an excitation source is rather difficult due to high fluorescence background. However, the application of photobleaching pre-treatment might solve this problem. In the case of blue automotive paints, sample irradiation performed prior to standard Raman measurement usually allows quenching or possibly reduction of fluorescence background. In the present study, positive results were obtained in 90% of samples. Although the phenomenon of fluorescence background quenching has not been researched widely, the process seems to be repeatable and durable. Moreover, the peak position and general shape of revealed bands associated with pigments in irradiated samples did not show any significant changes, therefore information about pigments could be obtained. In a group of 20 blue samples both solid and metallic paints, positive pigment identification was possible in 18 examples.

Acknowledgement

Examinations were supported by Institute of Forensic Research, Poland within the project No. III/K 2009–2011.

References

- [1] B. Caddy, *Forensic Examination of Glass and Paint: Analysis and Interpretation*, Taylor & Francis, New York, 2001.

- [2] T. Anderman, *Problems Forensic Sci.* XLVI (2001) 335–344.
- [3] J. Zięba-Palus, R. Borusiewicz, M. Kunicki, *Forensic Sci. Int.* 175 (2008) 1–10.
- [4] G. Jochem, R.J. Lehnert, *Sci. Justice* 42 (2002) 215–221.
- [5] J. Thomas, P. Buzzini, G. Massonnet, B. Reedy, C. Roux, *Forensic Sci. Int.* 152 (2005) 189–197.
- [6] J. de Gelder, P. Vandenabeele, F. Govaert, L. Moens, *J. Raman Spectrosc.* 36 (2005) 1059–1067.
- [7] P. Buzzini, G. Massonnet, F.M. Sermier, *J. Raman Spectrosc.* 37 (2006) 922–931.
- [8] J. Zięba-Palus, J. Wąs-Gubala, *J. Mol. Struct.* 993 (2011) 127–133.
- [9] J. Zięba-Palus, A. Michalska, A. Weselucha-Birczyńska, *J. Mol. Struct.* 993 (2011) 134–141.
- [10] J. Zięba-Palus, A. Michalska, *J. Forensic Sci.* (2014), <http://dx.doi.org/10.1111/1556-4029.12499>.
- [11] A.H. Kuptsov, *J. Forensic Sci.* 39 (1994) 305–318.
- [12] E.G. Bartick, P. Buzzini, *Raman spectroscopy in forensic science*, in: R.A. Meyers (Ed.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons Ltd., United Kingdom, 2009, pp. 1–10.
- [13] E.M. Suzuki, M. Carrabba, *J. Forensic Sci.* 46 (2001) 1053–1069.
- [14] G. Massonnet, W. Stoecklein, *Sci. Justice* 39 (1999) 181–187.
- [15] P. Buzzini, G. Massonnet, *Sci. Justice* 44 (2004) 123–131.
- [16] M. Skenderovska, B. Minčeva-Šukarova, L. Andreeva, *Maced. J. Chem. Chem. Eng.* 27 (1) (2008) 9–17.
- [17] C.S. Palenik, S. Palenik, E. Groves, J. Herb, *Raman Spectroscopy of Automotive and Architectural Paints: In situ Pigment Identification and Evidentiary Significance*, 2014 www.ncjrs.gov/pdffiles1/nij/grants/243162.pdf (accessed 12.03.2014).
- [18] M.E. Darvin, N.N. Brandt, J. Lademann, *Biomed. Opt. Spectrosc.* 109 (2010) 235–240.
- [19] H. Wang, J. Zhao, M.D. Lee, H. Lui, H. Zeng, *Photodiagn. Photodyn. Ther.* 9 (2012) 299–302.
- [20] K. Golcuk, G.S. Mandair, A.F. Callender, N. Sahar, D.H. Kohn, M.D. Moris, *Biochim. Biophys. Acta* 1758 (2006) 868–873.
- [21] A.C. Stowe, N. Smyrl, *Vib. Spectrosc.* 60 (2012) 133–136.
- [22] A.M. MacDonald, P. Wyeth, *J. Raman Spectrosc.* 37 (2006) 830–835.
- [23] B.B. Thompson, *Polym. Paint Colour J.* 199 (2009) 31–32.
- [24] P. Gregory, *J. Porphyrins Phthalocyanines* 4 (4) (2000) 432–437.

INSTYTUT EKSPERTYZ SĄDOWYCH

im. Prof. dra Jana Sehna

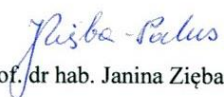
PL 31-033 Kraków, ul. Westerplatte 9
tel. (+48 12) 61 85 700, fax (+48 12) 422 38 50
e-mail: ies@ies.krakow.pl

Kraków, dnia 23 sierpnia 2017 r.

Oświadczenie

Oświadczam, iż w publikacji *Photobleaching as an useful technique in reducing of fluorescence in Raman spectra of blue automobile paint samples* opublikowanej w *Vibrational Spectroscopy* 2014 (74) 6-12 mój udział polegał na:

- merytorycznym nadzorze nad interpretacją uzyskanych wyników,
- współtworzeniu manuskryptu i weryfikacji treści odpowiedzi na recenzje,
- przeprowadzeniu procedury redakcyjnej.


prof. dr hab. Janina Zięba-Palus

Instytut Ekspertyz Sądowych
im. Prof. dra Jana Sehna w Krakowie
ul. Westerplatte 9, 31-033 Kraków

INSTYTUT EKSPERTYZ SĄDOWYCH

im. Prof. dra Jana Sehna

PL 31-033 Kraków, ul. Westerplatte 9
tel. (+48 12) 61 85 700, fax (+48 12) 422 38 50
e-mail: ics@ics.krakow.pl

Kraków, dnia 23 sierpnia 2017 r.

Oświadczenie

Oświadczam, iż w publikacji *Photobleaching as an useful technique in reducing of fluorescence in Raman spectra of blue automobile paint samples* opublikowanej w *Vibrational Spectroscopy* 2014 (74) 6-12 mój udział polegał na:

- ustaleniu ogólnej koncepcji badań,
- sformułowaniu hipotezy badawczej,
- opracowaniu metodologii wstępnego naświetlania próbek,
- przeprowadzeniu analiz lakierów samochodowych z wykorzystaniem spektrometrii ramanowskiej,
- interpretacji uzyskanych wyników,
- tworzeniu manuskryptu i odpowiedzi na recenzje.

Aleksandra Michalska

Instytut Ekspertyz Sądowych
im. Prof. dra Jana Sehna w Krakowie
ul. Westerplatte 9, 31-033 Kraków

Publikacja 3

Tytuł:	Application of a likelihood ratio approach in solving a comparison problem of Raman spectra recorded for blue automotive paints
Autorzy:	Michalska A. , Martyna A., Zięba-Palus J., Zadora G.
Czasopismo:	<i>Journal of Raman Spectroscopy</i>
Wartość <i>Impact Factor</i> :	2,671
Punkty MNiSW:	30
Cytowana w rozprawie jako:	Michalska i in. 2015

Research article

Journal of
RAMAN
SPECTROSCOPY

Received: 16 July 2014

Revised: 26 March 2015

Accepted: 27 April 2015

Published online in Wiley Online Library

(wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/jrs.4719

Application of a likelihood ratio approach in solving a comparison problem of Raman spectra recorded for blue automotive paints

Aleksandra Michalska,^a Agnieszka Martyna,^b Janina Zięba-Palus^a
and Grzegorz Zadora^{a,c,*}



Evidential values of Raman spectra recorded for solid and metallic blue car paints were evaluated using visual comparison as well as a statistical approach, i.e. likelihood ratio (LR) test supported by Empirical Cross Entropy (ECE) results. Raman spectra were obtained using a Renishaw inVia spectrometer equipped with a confocal Leica microscope and a near infrared semiconductor laser (785 nm) as an excitation source.

When a visual comparison was performed for solid paints, in 17.7% of comparisons (53 pairs out of 300) the samples were indistinguishable, whereas for metallic paints this value was 8.5% of such comparisons (37 pairs out of 435). Comparing the spectra using an LR approach was based on variables being the areas under the most significant Raman spectra bands of pigments present in the analysed samples. Proposed LR models delivered low false positive and false negative rates (for many models lower than 10%), and the ECE plots confirmed that their performance was much better than visual comparison. Copyright © 2015 John Wiley & Sons, Ltd.

Additional supporting information may found in the online version of this article at publisher's web site.

Keywords: Raman spectroscopy; blue car paints; likelihood ratio; comparison problem; forensic science

Introduction

Automotive paint samples belong to one of the most commonly analysed traces being found at a scene of hit-and-run accidents.^[1] Their forensic examination usually involves establishing their chemical composition and determining paint origin, i.e. within comparison or classification problems. When the comparison problem is solved the fragments of paint collected from the road or from the victim's clothes (a so-called recovered sample) are compared with the paint originating from the suspected car (a so-called control sample). The aim of comparative analysis is to evaluate the degree of similarity of physicochemical features between these paint samples and answering the question if recovered and control samples could have a common origin.

For the comparison of paints, various methods of optical microscopy are used. They allow establishing of morphological features of paint like number and thickness of particular paint layers as well as determining their colours and sequence.^[2] Spectroscopic methods are usually applied in order to compare colour and chemical composition of paint.^[3–9]

One of the methods routinely applied in comparative analysis of paint is Raman Spectroscopy (RS) which delivers information mainly about pigment composition. The method is based on measurement of the inelastic scattering of light being connected with non-polar bonds of the molecule and gives information about stretching vibrations of chemical groups. It is a kind of fingerprint by which molecules can be identified. The method allows to detect colourants in very low concentrations in the presence of other less scattering components like binders, extenders etc. and does not

require any special sample preparation prior to analysis. The non-destructiveness of the method and capability of analysing very small samples with a diameter of less than 10 µm as well as paints without a full layer structure or in a form of smears make the RS technique widely used in the forensic analysis of car paints.

Until now, Raman Spectroscopy was used for the identification of inorganic pigments and resins^[10,11] as well as for the analysis of both pigments and extenders.^[12] Distribution of pigments in paint layers with the use of a mapping technique was also presented.^[13] So far, the discrimination abilities of the Raman technique based on different pigment content were shown for a group of green,^[14] blue^[15] and red automotive topcoats.^[16] Usefulness of the method in discrimination of paint carried out in real cases was also shown in a few examples.^[17,19]

Nevertheless, in most cases, the comparison problem of automotive paints was solved using a procedure based upon visual comparison of Raman spectra obtained for a recovered and a control sample. In a case where the compared samples were totally

* Correspondence to: Grzegorz Zadora, Department of Criminalistics, Institute of Forensic Research, Westerplatte 9, 31-033 Krakow, Poland. E-mail: gzadora@ies.krakow.pl

a Institute of Forensic Research, Westerplatte 9, 31-033 Krakow, Poland

b Faculty of Chemistry, Jagiellonian University, Ingardena 3, 30-060 Krakow, Poland

c Department of Analytical Chemistry, Chemometric Research Group, Institute of Chemistry, The University of Silesia, Szkolna 9, 40-006 Katowice, Poland

different, because of different pigment composition, this methodology seemed to be accurate. However, in examples where RS confirmed the presence of the same sets of pigments, evaluation of the degree of similarity between paints based upon some coarse verbal scale of the expert seems to be insufficient.

An evaluation process of any kind of data (E) being the subject of forensic evaluation should take into account the following factors in the context of two adversative propositions (θ_1 —two fragments of car paints come from the same source and θ_2 —two fragments of car paints have different sources), i.e.:

- sources of error(s), i.e. the variation of spectra measured for a sample of car paint (so-called within-object variability) and the variation of spectra measured for various samples of car paints (so-called between-object variability),
- the rarity of particular features being the basis of the evaluation process (e.g. presence or absence of particular bands). In the forensic field, the analysis of rarity is an important part of the evaluation of the evidential value of physicochemical data. For instance, in the comparison problem, one would expect values of a particular feature from different locations on the same car paint fragment to be very similar. However, equally similar values could also be observed for different car paints. Therefore, information about the rarity of the determined feature has to be taken into account by applying the following simple rule—the value of the evidence in support of the hypothesis that the recovered and control samples (e.g. car paints fragments) have a common origin (θ_1) is greater when the observations are similar and rare in the relevant population, than when these physicochemical data are equally similar but common in the same population. In practice this means that the conditional probabilities $\Pr(E|\theta_1)$ and $\Pr(E|\theta_2)$ should be estimated.^[20–22]

In order to evaluate the rarity of the observed features in the case of RS measurements, some authors proposed the population study.^[18] However, variability in the compared spectra from different sources was still evaluated by the experts' eyes and was their subjective opinion. Moreover, in this approach, determination of within-object variability could not be estimated in an objective way.

Some research involving the application of chemometric methods to discriminate between samples based upon their Raman spectra was also presented.^[23–26] Principal component analysis (PCA) was used in the differentiation of spray paints^[23] as well as tempera paint model samples.^[24] Two methods—PCA and hierarchical cluster analysis (HCA) were applied in the discrimination of red household paints,^[25] whereas linear discriminant analysis (LDA) was used for recognition and discrimination of copper phthalocyanine polymorphs.^[26]

Nevertheless, PCA and HCA are unsupervised techniques, and they should only be used as exploratory techniques, i.e. not for classification or comparison tasks. They only allow analysing the structure of multivariate data, presenting them in a graphical form, finding relations between objects or variables in the multivariate space or reducing the dimensionality of a problem. The rarity, for example, cannot be included in either PCA or HCA; thus, such methods do not fulfil the requirements for the evaluation of the evidential value of physicochemical data. It should be also mentioned that LDA (supervised technique) does not provide directly information on the probability of given evidence ($\Pr(E|\theta_1)$ and $\Pr(E|\theta_2)$) as is required in forensic science. Even though LDA outcomes can be

transformed into these probabilities and provide some outline for expressing the evidential value, they suffer from the *curse of dimensionality*, when the number of samples is limited in regard to the number of variables they describe.

The method which allows the forensic scientist to include all of the above mentioned factors in a single, easily comprehended, calculation is the likelihood ratio approach ($LR = \Pr(E|\theta_1) / \Pr(E|\theta_2)$), which is a widely accepted measure of evidential value in the forensic sciences.^[20,21]

Calculation of LR values allows obtaining information which hypothesis is supported by the data (E) and suggests how strong this support is. Values of the likelihood ratio above unity support the prosecutor's hypothesis (θ_1), while values of LR below one support the defence hypothesis (θ_2). Values of the likelihood ratio equal to one support neither of the hypotheses. In general terms, the higher the value of the likelihood ratio, the stronger is the support for the prosecution proposition (θ_1). The lower the value of the likelihood ratio, the stronger is the support for the defence proposition (θ_2).

The aim of the presented research was to investigate whether the likelihood ratio approach could be successfully used for comparing Raman spectra in a quantitative and reproducible way. Results of the application of the LR approach to Raman spectra of blue automotive paints were presented and compared with results of commonly practiced visual Raman spectra comparison. Moreover, some ideas on data pre-treatment (spectra reconstruction or baseline correction performed in order to eliminate fluorescence) were also analysed.

Materials and methods

Samples

The collection of automotive paint samples consisted of 25 solid and 30 metallic blue car paints originating from bodies of damaged cars (Table S1 (Supporting Information)). The type of paint, i.e. metallic or solid could be easily determined even in cases of very small samples therefore differentiation of paints was performed for each group separately. Although some paints within each group varied in shade, visual comparison of their colour was not performed. Raman Spectroscopy was chosen as the only discriminating technique.

Raman microspectroscopy

Raman spectra were obtained using a Renishaw inVia spectrometer equipped with a confocal Leica microscope and near infrared semiconductor laser (785 nm) as an excitation source. The laser beam was focused on samples by 50 \times (N.A. = 0.75) objective lens, which gives a theoretical spot size of approximately 2 μ m. The light was dispersed by a diffraction grating with 1200 grooves/mm. The signal was recorded using a Peltier-cooled charged coupled device (CCD). Spectral data was processed with Renishaw Wire 3.2 software. Spectra of all samples were recorded *in situ* in the region of 200–2500 cm^{-1} with an acquisition time of 10 s and collection of five accumulations. The laser power applied while recording Raman spectra used 1% or 0.5% of its maximum power (300 mW \pm 30 mW). Each paint sample was measured at least three times in different spots.

Database creation

Data was collected in two databases, i.e. one for solid and one for metallic car paint samples. They were used in order to estimate

parameters used in LR models (means, variances and covariances; see Section on likelihood ratio (LR) approach) as well as in order to evaluate the performance of the applied methodology for solving the comparison problem supported by LR approach (expressed by levels of false positive and false negative answers and Empirical Cross Entropy plots; See Section on Empirical Cross Entropy).

During the database creation, some problems concerning the data format occurred. It was observed that the raw spectra recorded on different days differed amongst themselves in wavenumbers, for which intensity was measured. For example, in one spectrum, data was collected starting at $149,069\text{ cm}^{-1}$ and finishing at $2499,260\text{ cm}^{-1}$, while in another spectrum data collection started at $150,941\text{ cm}^{-1}$ and finished at $2499,700\text{ cm}^{-1}$. Additionally, the signal intensities were measured for wavenumbers with a changing step within a single spectrum. In this situation, the recorded spectra were not in fact what is called a *signal* in chemometrics or statistics because of unequally spaced data. Apart from theoretical requirements, such discrepancies create an unwanted situation because it becomes impossible to describe all the samples by signal intensities measured for a unique set of wavenumbers (variables).

Another reason for the necessity to deal with the problem was the application of wavelet transform for baseline correction to eliminate the fluorescence observed in raw Raman spectra. Wavelet transform is a time–frequency decomposition of signals, in contrary to Fourier transform, which is only frequency resolved.^[27] It enables the signal (e.g. spectrum) projecting onto the new basis of functions called *wavelets*. Continuous wavelet transform (CWT)^[28] applied for the analysed signals enabled for preserving the true signal information and separated the peaks from the low frequency baseline^[29] (mainly attributed to the fluorescence effect). The baseline drift of each individual spectrum was removed using the Mexican hat wavelet^[27] with the same set of CWT parameters for each spectrum. Because wavelet transform is a technique dealing with signals, it requires equally spaced data which number is two to the power of n ($N=2^n$). Because of the mentioned reasons, each spectrum was reconstructed using two interpolation methods in order to obtain the missing information before CWT. In each of the proposed methods the new set of wavenumbers was given to three decimal places as for raw spectra.

To produce equally spaced data, a set of 1024 new variables (wavenumbers) within the limited range $200,000\text{--}2300,000\text{ cm}^{-1}$ (sampled every ca. $2,053\text{ cm}^{-1}$) was created so that they covered the whole range of Raman spectrum containing relevant chemical information (original raw data was recorded in $200\text{--}2500\text{ cm}^{-1}$). The first method of spectra reconstruction was a linear interpolation, in which intensity at each wavenumber (variable) of the new set of 1024 variables was estimated from the linear equation ($y = ax + b$). For example, within the set of the 1024 variables, there is a variable $x = 230,792\text{ cm}^{-1}$ for which intensity (y) should be estimated. Two points from the original spectrum being nearest neighbours to the point x were chosen, with values of wavenumbers lower (x_1, y_1) and higher (x_2, y_2) than the wavenumber x ($x_1 = 230,406\text{ cm}^{-1}$, $y_1 = 100,389$ and $x_2 = 232,609\text{ cm}^{-1}$, $y_2 = 102,028$). This data was used to estimate parameters a and b in the linear equation $y = ax + b$ and to reconstruct the intensity value for $x = 230,792\text{ cm}^{-1}$, i.e. $y = 100,676$. This procedure was performed in order to reconstruct the intensities at each point within a set of new 1024 variables for each of the spectra.

The second method involved spline interpolation^[30] in which cubic polynomials were used for fitting the spectrum and reconstructing its intensity values for a set of 1024 established

wavenumbers. Such reconstructed spectra were subjected to wavelet transform for removing the baseline and normalised so that the highest peak in each spectrum had an intensity of 100. Two different types of spectra reconstruction (i.e. linear and spline) were applied for verifying whether dealing with not original but somehow reconstructed spectra has any negative effect on commenting on the similarity between the spectra. It seems to be of great importance as it may be the cause of some substantial changes in the spectra to which the LR models may not be resistant enough.

Reconstructed Raman spectra were narrowed down to the most informative regions (Table 1). A previous study performed on blue automotive paints^[15] showed that their colour and shade originated from the following organic pigments: copper phthalocyanine—Pigment Blue 15, indanthrone—Pigment Blue 60, dioxazine violet—Pigment Violet 23 or chlorinated copper phthalocyanine commonly known as a Pigment Green 7. Therefore, selected regions related to characteristic bands of these particular pigments or to the regions where information about two or more pigments simultaneously could occur. So each recorded spectrum was described by new variables being areas under these bands. Finally, solid car paints were described by 10 variables, and metallic car paints were described by eight new variables (Table 1).

Experiments on evaluation of evidential value of Raman spectra

Pigment identification and visual comparison of spectra

Pigment identification was based on the reference spectra database which had previously been created in the Institute of Forensic Research in Krakow. Visual comparison of spectra was based on raw data covering the same range of the Raman spectrum as those used in statistical approach, i.e. $200\text{--}2300\text{ cm}^{-1}$. Narrowing down the spectrum range (original raw data was recorded in

Table 1. Ranges of wavenumbers for bands which were selected for analysis. New variables were the areas under the Raman spectrum within the established ranges of wavenumbers

Variable	Min [cm^{-1}]	Max [cm^{-1}]
Solid car paints		
PG7a	725	744
PG7e	807	824
PG7b	1270	1300
PG7c	760	790
PB15a	744	765
PB15b	1124	1177
PV23a	1370	1415
PV23b	1415	1440
PG7aPB15a	725	765
PB15cPG7d_2	1490	1565
Metallic car paints		
PG7a1	735	744
PB15a	744	765
PB60a	790	810
PB15dPG7fPV23c	1333	1350
PB60b	1350	1370
PV23aPB60c	1370	1415
PV23b	1415	1440
PB15cPG7d_1	1490	1580

200–2500 cm⁻¹) did not affect identification and discrimination process, because all peaks associated with pigments were observed in the range of 200–2300 cm⁻¹. In each group of paints (solid and metallic considered separately) two types of comparisons were performed in order to estimate false positive and false negative rates.

For estimation of false positive rates discrimination between Raman spectra recorded for different paints was performed. First, RS spectra were divided into classes according to the presence of main pigment or their mixtures. Then within each class, pair-wise comparisons of spectra were performed. When any spectral differences occurred in terms of the absence or presence of other peaks the further discrimination was done. Significant changes in peaks height relating to various pigments which pointed out on their different content in compared paints were the basis of further differentiation. Changes in Raman line appearance like lifting a background line were not taken into account. Pair-wise comparisons of spectra between classes were pointless because of different pigment composition assigned to those spectra. Therefore it was stated that they differ between themselves.

For estimation of false negative rates the differences between replicates recorded for each single paint were checked. The spectra were normalised and then overlaid in Wire 3.2 software. Each spectrum within a group of replicates was carefully observed for any changes in the presence or absence of additional bands. The changes in the Raman line appearance connected with the background drift or slight changes in peak height which were not pointed out for different pigments content were not taken into account.

Likelihood ratio (LR) approach

In general, LR models used for the evaluation of continuous type of physicochemical data are based on the following ideas. In the case of the comparison problem a background database is available with n_i ($i = 1, \dots, m$) measurements of p characteristics on each of m objects, so that data is in the form of p -vectors $\mathbf{x}_{ij} = (x_{ij1}, \dots, x_{ijp})^T$ for $i = 1, \dots, m$ and $j = 1, \dots, n_i$. Information collected in the database is used for the estimation of LR model parameters, like means, variances and covariances. The object means of these measurements are $\bar{\mathbf{x}}_i = \frac{1}{n_i} \sum_{j=1}^{n_i} \mathbf{x}_{ij}$.

The measurements made on the control and recovered samples are, respectively, expressed as $\mathbf{y}_{1j} = (y_{1j1}, \dots, y_{1jp})^T$, $j = 1, \dots, n_1$ and $\mathbf{y}_{2j} = (y_{2j1}, \dots, y_{2jp})^T$, $j = 1, \dots, n_2$. The means of the control and recovered samples are $\bar{\mathbf{y}}_l = \frac{1}{n_l} \sum_{j=1}^{n_l} \mathbf{y}_{lj}$ for $l = 1, 2$. The weighted mean is defined as $\mathbf{y}^* = \frac{n_1 \bar{\mathbf{y}}_1 + n_2 \bar{\mathbf{y}}_2}{n_1 + n_2}$.

The prosecution proposition, θ_1 , states that the control and recovered samples described by their means, $\bar{\mathbf{y}}_1$ and $\bar{\mathbf{y}}_2$, respectively, came from the same object, while the defence proposition, θ_2 , states that they came from different objects. The likelihood ratio giving the strength of the evidence in favour of the prosecution proposition is of the form

$$LR = \frac{f(\bar{\mathbf{y}}_1, \bar{\mathbf{y}}_2 | \theta_1, \mathbf{U}, \mathbf{C})}{f(\bar{\mathbf{y}}_1, \bar{\mathbf{y}}_2 | \theta_2, \mathbf{U}, \mathbf{C})}$$

where $f(\cdot)$ is the joint density of the two means.

A within-object distribution is assumed to be multivariate normal, i.e. $(\mathbf{x}_{ij} | \theta_i, \mathbf{U}) \sim N_p(\theta_i, \mathbf{U})$ for $i = 1, \dots, m$ and $j = 1, \dots, n_i$. θ_i is the i th object mean vector and \mathbf{U} is a $p \times p$ within-object variance-covariance matrix. It is estimated from $\hat{\mathbf{U}} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^m \frac{n_i}{n_i - 1} \mathbf{S}_{wi}$, where

$$\mathbf{S}_{wi} = \sum_{j=1}^{n_i} (\mathbf{x}_{ij} - \bar{\mathbf{x}}_i)(\mathbf{x}_{ij} - \bar{\mathbf{x}}_i)^T \text{ and } N = \sum_{i=1}^m n_i. \text{ A between-object variance estimate is } \hat{\mathbf{C}} = \frac{N}{N^2 - \sum_{i=1}^m n_i^2} (\mathbf{S}_b - (m-1)\mathbf{U}) \text{ with}$$

$$\mathbf{S}_b = \sum_{i=1}^m n_i (\bar{\mathbf{x}}_i - \bar{\mathbf{x}})(\bar{\mathbf{x}}_i - \bar{\mathbf{x}})^T, \text{ where } \bar{\mathbf{x}} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^m n_i \bar{\mathbf{x}}_i.$$

Because the between-object distributions cannot be assumed normal in the case of the analysed Raman spectra (see Figs. S1 and S2 (Supporting Information)), a nonparametric approach, i.e. a kernel density estimation, is adopted for modelling the between-object distribution using Gaussian kernels:

$$f(\theta | \bar{\mathbf{x}}_1, \dots, \bar{\mathbf{x}}_m, \mathbf{C}, h) = \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m (2\pi)^{-p/2} |h^2 \mathbf{C}|^{-1/2} \exp \left\{ -\frac{1}{2} (\theta - \bar{\mathbf{x}}_i)^T (h^2 \mathbf{C})^{-1} (\theta - \bar{\mathbf{x}}_i) \right\}.$$

The smoothing parameter h , used in kernel density estimation, is taken to equal its optimal value, $h_{opt} = \left(\frac{4}{m(2p+1)} \right)^{1/(p+4)}$, where p is the number of variables and m is the number of observations in the background database. Optimality of the smoothing parameter expressed as above holds for Gaussian kernels according to the Silverman proposition for multivariate data.^[31]

This all combines so that the numerator of the LR formula could be expressed as:^[21,22]

$$(2\pi)^{-p/2} \left| \frac{\mathbf{U}}{n_1} + \frac{\mathbf{U}}{n_2} \right|^{-1/2} \exp \left\{ -\frac{1}{2} (\bar{\mathbf{y}}_1 - \bar{\mathbf{y}}_2)^T \left(\frac{\mathbf{U}}{n_1} + \frac{\mathbf{U}}{n_2} \right)^{-1} (\bar{\mathbf{y}}_1 - \bar{\mathbf{y}}_2)^T \right\} \\ \times \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m \left\{ (2\pi)^{-p/2} \left| \frac{\mathbf{U}}{n_1 + n_2} + h^2 \mathbf{C} \right|^{-1/2} \exp \left[-\frac{1}{2} (\bar{\mathbf{y}}^* - \bar{\mathbf{x}}_i)^T \left(\frac{\mathbf{U}}{n_1 + n_2} + h^2 \mathbf{C} \right)^{-1} (\bar{\mathbf{y}}^* - \bar{\mathbf{x}}_i)^T \right] \right\} \quad (1)$$

The denominator assumes independence of $\bar{\mathbf{y}}_1$ and $\bar{\mathbf{y}}_2$ and can be factorised into two terms, one for $\bar{\mathbf{y}}_1$ and another for $\bar{\mathbf{y}}_2$.^[21,22]

$$(2\pi)^{-p/2} \left| \frac{\mathbf{U}}{n_1} + h^2 \mathbf{C} \right|^{-1/2} \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m \exp \left\{ -\frac{1}{2} (\bar{\mathbf{y}}_1 - \bar{\mathbf{x}}_i)^T \left(\frac{\mathbf{U}}{n_1} + h^2 \mathbf{C} \right)^{-1} (\bar{\mathbf{y}}_1 - \bar{\mathbf{x}}_i)^T \right\} \\ \times (2\pi)^{-p/2} \left| \frac{\mathbf{U}}{n_2} + h^2 \mathbf{C} \right|^{-1/2} \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m \exp \left\{ -\frac{1}{2} (\bar{\mathbf{y}}_2 - \bar{\mathbf{x}}_i)^T \left(\frac{\mathbf{U}}{n_2} + h^2 \mathbf{C} \right)^{-1} (\bar{\mathbf{y}}_2 - \bar{\mathbf{x}}_i)^T \right\} \quad (2)$$

In the case of univariate data ($p = 1$) all data vectors and matrices become scalars, e.g. within-object variance-covariance matrix \mathbf{U} becomes within-object variance u^2 .

False positive and false negative answers

A number of experiments were undertaken in order to evaluate the performance of both visual and statistical approaches. In the case of a comparison problem, these included:

Likelihood ratio approach for evaluation of Raman spectra of car paints

a) the rates of false positive answers, which were evaluated by comparing spectra obtained for two different paints, which gives

$$N_d = \binom{25}{2} = \frac{25!}{2!(25-2)!} = \frac{24 \cdot 25}{2} = 300 \text{ comparisons within the solid}$$

car paint samples database and 435 within the metallic car paint samples database. In a statistical (LR) approach the desirable answer for LR was $LR < 1$; hence each value of $LR > 1$ was considered a false positive answer.

b) the rates of false negative answers were estimated by forming two samples, control and recovered, from observations for a single object. If the number of the measured spectra for the sample was even, both parts were equinumerous. Otherwise, the first part (acting as the control sample) had one spectrum more than the second one (acting as the recovered sample). The number (N_p) of performed comparisons was 25 within the solid car paint samples database and 30 within the metallic car paint samples database. The desirable response for LR was $LR > 1$. Each value of $LR < 1$ was considered a false negative answer.

Empirical Cross Entropy

It is important that the statistical method used for the evaluation of evidence delivers strong support for the correct hypothesis (i.e. in the case of the likelihood ratio approach, $LR > 1$ when θ_1 is correct, and $LR < 1$ when θ_2 is correct). Additionally, it is desired that if an incorrect hypothesis is supported by LR value then the LR value should be close to 1 as it allows for the delivery of weak misleading evidence. Roughly speaking, according to the equation of Bayes theorem:

$$\frac{\Pr(\theta_1)}{\Pr(\theta_2)} \cdot \frac{\Pr(E|\theta_1)}{\Pr(E|\theta_2)} = \frac{\Pr(\theta_1)}{\Pr(\theta_2)} \cdot LR = \frac{\Pr(\theta_1|E)}{\Pr(\theta_2|E)} \quad (3)$$

It seems to be of great importance for forensic experts to obtain LR values that do not provide strong misleading information for the fact finders.

A method which could be used for assessing the LR model performance is Empirical Cross Entropy.^[21,32,33] It concerns the strength of the support towards θ_1 or θ_2 provided by LR values by involving logarithmic scoring rules for penalising the incorrect outcomes of the applied model:

$$\text{a) if } \theta_1 \text{ is true: } -\log_2(\Pr(\theta_1|E)),$$

$$\text{b) if } \theta_2 \text{ is true: } -\log_2(\Pr(\theta_2|E)).$$

The higher the support for the incorrect hypothesis, the greater penalty is assigned to the model's response. The models with the best performance reduce the information loss after analysing the physicochemical data, i.e. reduce the uncertainty about the correct hypothesis.

In Brümmer and du Preez^[32] the overall penalty is defined as the average value of a strictly proper scoring rule over many different outcomes (expressed by posterior probabilities, Eqn (3)) obtained from the experiments performed under θ_1 and θ_2 hypotheses (e_i referring to evidence information considered under θ_1 hypothesis and e_j referring to evidence information considered under θ_2 hypothesis):

$$LS = -\frac{1}{N_p} \sum_{i \in N_p} \log_2(\Pr(\theta_1|e_i)) - \frac{1}{N_d} \sum_{j \in N_d} \log_2(\Pr(\theta_2|e_j)) \quad (4)$$

where N_p , N_d refer to the number of the comparisons made under each of the considered propositions θ_1 and θ_2 . This average value,

LS, can be viewed as an overall loss. The ECE is the proposed measure of goodness as a variant of LS and is expressed as follows:

$$ECE = -\frac{\Pr(\theta_1)}{N_p} \sum_{i \in N_p} \log_2(\Pr(\theta_1|e_i)) - \frac{\Pr(\theta_2)}{N_d} \sum_{j \in N_d} \log_2(\Pr(\theta_2|e_j)). \quad (5)$$

Taking into account Eqn (3), it can be seen that ECE could be expressed as:

$$ECE = \frac{\Pr(\theta_1)}{N_p} \sum_{i \in N_p} \log_2 \left(1 + \frac{\Pr(\theta_2)}{LR_i \Pr(\theta_1)} \right) + \frac{\Pr(\theta_2)}{N_d} \sum_{j \in N_d} \log_2 \left(1 + \frac{LR_j \Pr(\theta_1)}{\Pr(\theta_2)} \right) \quad (6)$$

The prior probabilities $\Pr(\theta_1)$ and $\Pr(\theta_2)$ are not generally known in the forensic evaluation of the evidence, because they depend on various information sources: witnesses, police investigations, other evidence, etc. Because ECE cannot be computed if prior probabilities are not known, the adopted solution is to plot ECE for a set of all possible prior probability quotients, further referred to as prior odds and expressed as logarithm $\log_{10} \text{Odds}(\theta)$. Equation (6) is the basis of the ECE plot with three curves^[21,33] (see e.g. Fig. 2):

- the black dotted line is the ECE for the *null* likelihood ratio, that is where the observations are giving no information about the source of the sample, and that the likelihood ratio is always equal to one.
- the blue dashed line is the ECE for the *calibrated* set. This represents a theoretical best set of ECEs for the feature set where there no losses of information because of calibration. This is denoted as $C_{\text{lin}}^{\text{min}}$ for prior log odds equal to zero and represents the likelihood ratio values set of the best performance of all other likelihood ratio sets offering the same discriminating power, and is calculated using the Pool Adjacent Violators (PAV) algorithm.^[34]
- finally, the red solid line is the ECE for the *observed* likelihood ratios (Eqn (6)), and represents the loss of information about sample source from the features that have actually been observed, and has been denoted as C_{li} for prior log odds equal to zero.

The interpretation of the relative location of the ECE curve for experimental LR values (Fig. 2) in relation to the remaining two illustrates the performance of the method of evidence evaluation. If the LR values of the evidence evaluation process are misleading to the fact finder, then the ECE will grow, and more information on average will be needed in order to know the true hypotheses. In other words, the higher the curve (Fig. 2), the more uncertainty remains and therefore the worse the method of choice is for interpretation of the evidence under analysis. If the curve appears to have greater values than the ones in the neutral (*null*) method, the evidence evaluation introduces more misleading information than when not evaluating the evidence at all and therefore the method within the range of occurrence of such a situation is treated as a great misuse.

Software

Data pre-treatment and LR calculations were performed with the use of the routines written by the authors in R software.^[21,35]

Results and discussion

Most Raman spectra were of good quality and bands originating from pigments were clearly visible above background. Therefore pigment identification and visual discrimination of spectra were possible. However, even when spectra were of good quality a lift of background probably caused by fluorescence was observed. To avoid its influence on the evaluation of evidential value of spectra in the likelihood ratio approach, baseline correction with the use of wavelet transform was applied. The effect of baseline correction was shown in Fig. 1.

Descriptive statistics

Figures S1 and S2 (Supporting Information) present probability density plots of each variable obtained when the spectra were reconstructed using linear or spline interpolation within solid and metallic car paints databases, respectively. It could be easily observed that in most cases, the probability density plots overlap, i. e. both methods of spectra fitting deliver the same information on peak area. It could also be pointed out that the distributions do not have a normal distribution shape. Therefore, kernel density estimation approach was applied in order to estimate probability density functions of between-object data distribution in the LR model (Eqns (1)–(2)).

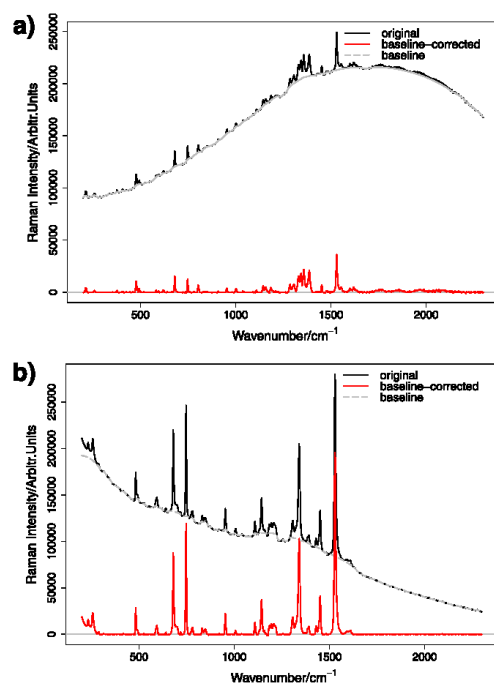


Figure 1. Raman spectra of (a) metallic (b) solid blue car paint before and after baseline correction performed with the use of wavelet transformation.

Evaluation of evidential value of Raman spectra

Pigment identification and visual comparison of spectra

Pigment identification performed previously in both groups of samples showed that their colour and shade originate from the following organic pigments: copper phthalocyanine—PB 15, indanthrone—PB 60, dioxazine violet—PV 23 and chlorinated copper phthalocyanine—PG 7.^[15] The bands associated with brominated copper phthalocyanine (PG 36) were only found in one metallic paint.

In visual comparison of spectra recorded for different paint samples (estimation of false positive rates) the first discrimination was performed according to the presence of main pigment or their mixture. In a group of solid paints copper phthalocyanine pigment was identified almost in all samples. However, in some paints the most intensive bands from other pigments were revealed which allowed to put spectra into three main classes. The biggest class consisted of paints containing only PB 15 (12 samples). The second class was created with paints in which PB 15 and two most intensive bands of PV 23, i.e. 1392 cm⁻¹ and 1433 cm⁻¹ occurred (10 samples). In the third class paints containing PB 15 and PG 7 were put (three samples). Raman spectra of metallic paints were divided into six classes. The most frequent pigment composition was PB 60 (nine samples) and a mixture of PB 15 with PB 60 (eight samples). Other paints contained PB 15 with PV 23 (six samples) or only PB 15 (three samples). The last two classes consisted of paints containing PG 7 as a main pigment (three samples), and a mixture of PB 15 and PG 36 (one sample). Pair-wise comparisons performed within each class separately allowed for further discrimination. Finally, in a group of solid paints 17.7 % of samples (53 pairs out of 300) became indistinguishable, whereas for metallic ones 8.5% (37 pairs out of 435 being compared). Results of visual discrimination of spectra recorded for different paints are presented in Table 2 and Table S2 (Supporting Information).

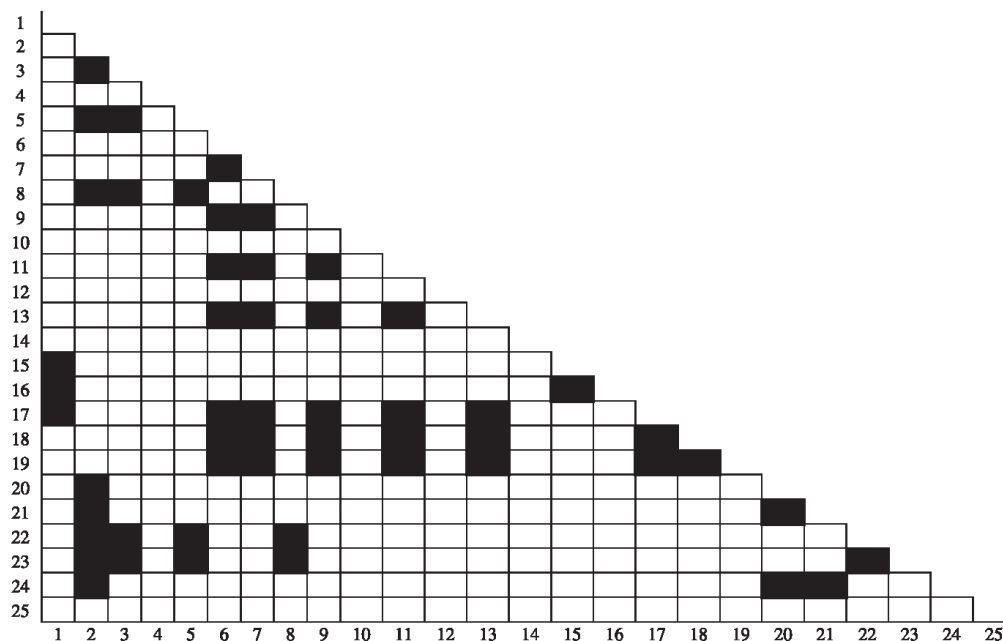
Visual comparison of replicates recorded for each paint (estimation of false negative rates) shows that obtained spectra were rather similar. The differences in terms of extra peaks were not observed. However, sometimes small changes occurred. Nevertheless, it was stated that in a real forensic case such changes as observed between replicates would be insufficient to make a decision about the differences between real recovered and control samples. So visual comparison did not allow for the determination of percentages of false negative answers.

Likelihood ratio approach

It is well known that as much useful information about a sample as possible should be included in the process of the evidence evaluation, e.g. within a comparison problem. Therefore, multidimensional LR models should be used, if possible. Nevertheless, the application of multivariate LR models (Eqns (1) and (2)) requires the modelling of multivariate probability density functions. In general, there is a lack of enough background data in many forensic databases, from which the parameters of the assumed distributions such as means, variances and covariances (Eqns (1) and (2)) could be estimated in a reliable way.

Some approaches to solve the problem of multidimensionality could be proposed. For example, it could be assumed that the variables (p) are independent in order to reduce the number of parameters to be estimated. Then, the so-called naïve LR model could be calculated ($LR_N = \prod_{i=1}^p LR_i$). A graphical method^[36] of estimating the

Likelihood ratio approach for evaluation of Raman spectra of car paints

Table 2. Results of visual discrimination of Raman spectra recorded for 25 solid blue car paints (estimation of false positive rates). Black squares denote car paints, for which Raman spectra were visually indistinguishable**Table 3.** The correlation coefficients matrix for the analysed variables proposed for solid car paints when their spectra were reconstructed using linear and spline interpolation. The upper triangle of the matrix is given by symmetry

Variable	PG7a	PG7e	PG7b	PG7c	PB15a	PB15b	PV23a	PV23b	PG7aPB15a	PB15cPG7d_2
PG7a	1.000									
PG7e	0.721 ^{a)} 0.772 ^{b)}	1.000								
PG7b	0.892 0.893	0.816 0.818	1.000							
PG7c	0.941 0.944	0.613 0.616	0.776 0.785	1.000						
PB15a	−0.067 −0.079	−0.241 −0.262	−0.063 −0.071	−0.004 −0.024	1.000					
PB15b	−0.566 −0.570	−0.673 −0.674	−0.594 −0.596	−0.537 −0.549	0.628 0.634	1.000				
PV23a	−0.071 −0.068	−0.100 −0.080	0.050 0.051	−0.209 −0.202	0.265 0.270	0.274 0.263	1.000			
PV23b	−0.500 −0.502	−0.534 −0.530	−0.415 −0.419	−0.589 −0.591	0.437 0.444	0.671 0.671	0.776 0.771	1.000		
PG7aPB15a	0.913 0.910	0.601 0.591	0.806 0.803	0.900 0.898	0.309 0.306	−0.334 −0.329	0.021 0.027	−0.319 −0.316	1.000	
PB15cPG7d_2	0.881 0.876	0.704 0.679	0.839 0.833	0.837 0.839	0.231 0.236	−0.402 −0.390	−0.054 −0.053	−0.383 −0.381	0.932 0.931	1.000

^{a)}Spectra reconstructed using linear interpolation.^{b)}Spectra reconstructed using spline interpolation.

Table 4. Levels of false positive and false negative LR model responses. (One false positive answer for solid car paints corresponds to 0.33% and one false negative answer is equal to 4%. For metallic car paints one false positive answer gives 0.23% and one false negative answer stands for 3.3%)

Variable	Spline ^a		Linear ^b	
	False positive [%]	False negative [%]	False positive [%]	False negative [%]
Solid car paints				
Univariate LR models				
PG7a	9.7	4.0	9.3	0.0
PG7e	30.0	12.0	27.3	12.0
PG7b	8.7	8.0	8.7	4.0
PG7c	13.7	4.0	13.3	0.0
PB15a	25.7	4.0	24.7	4.0
PB15b	20.7	8.0	20.7	0.0
PV23a	11.3	4.0	11.0	8.0
PV23b	12.0	0.0	13.3	4.0
PG7aPB15a	8.3	4.0	9.3	0.0
PB15cPG7d_2	8.3	4.0	9.0	8.0
Naïve LR models				
PG7aPB15a and PV23a	1.3	4.0	1.3	0.0
PV23a and PB15cPG7d_2	3.0	4.0	2.3	12.0
Bivariate LR models				
{PG7aPB15a, PB15cPG7d_2}	3.7	8.0	3.3	8.0
{PG7c, PG7aPB15a}	5.3	4.0	5.3	4.0
Metallic car paints				
Univariate LR models				
PG7a1	16.1	10.0	16.3	10.0
PB15a	18.4	6.7	18.4	6.7
PB60a	26.0	3.3	25.5	3.3
PB15dPG7fPV23c	26.9	3.3	26.4	3.3
PB60b	12.4	3.3	12.9	3.3
PV23aPB60c	13.8	3.3	14.5	0.0
PV23b	21.1	3.3	19.3	3.3
PB15cPG7d_1	16.1	10.0	16.1	6.7
Naïve LR model				
PB15cPG7d_1 and PB15dPG7fPV23c	8.1	6.7	7.6	6.7
Bivariate LR models				
{PB60b, PV23aPB60c}	8.7	3.3	9.0	3.3
{PB60b, PB15dPG7fPV23c}	4.4	3.3	4.8	6.7
{PV23aPB60c, PB15dPG7fPV23c}	4.1	6.7	3.7	6.7

^aSpectra reconstructed using spline interpolation.^bSpectra reconstructed using linear interpolation.

dependency structure among the variables has been used to reduce the multivariate problem to several models of lower dimensions. This approach is based on estimation of partial correlation coefficients and analysis of dependencies between variables.^[21,37] Table 3 and Table S3 (Supporting Information) present partial correlation coefficients between considered variables in both databases. As could be easily observed any significant differences between values obtained for data collected from spectra reconstructed using spline or linear techniques were observed. Moreover, variables relating to the same pigment revealed the highest correlations and at the same time variables from various pigments revealed a very weak correlation. Therefore, the following LR models were investigated:

- (a) univariate LR models (calculated according to univariate equivalents of Eqns (1) and (2)), in order to find out whether

any single variable could be helpful in solving the analysed comparison problem,

- (b) naïve LR models—constructed by multiplication of results of univariate LR models for selected low correlated (Table 3 and Table S3 (Supporting Information)) variables which represent various pigments observed in the analysed samples.
- (c) bivariate LR models (calculated according to Eqns (1) and (2))—constructed for two variables revealing high correlation (Table 3 and Table S3 (Supporting Information)) but originating from as many pigments as possible.

It is well known that tuning and test sets should be created when a particular model for data interpretation is analysed. In this study only 25 or 30 car paint samples were available in the databases, and it was difficult to create such sets. Therefore, a jack-knife procedure was applied in order to optimally use the available databases. The jack-knife

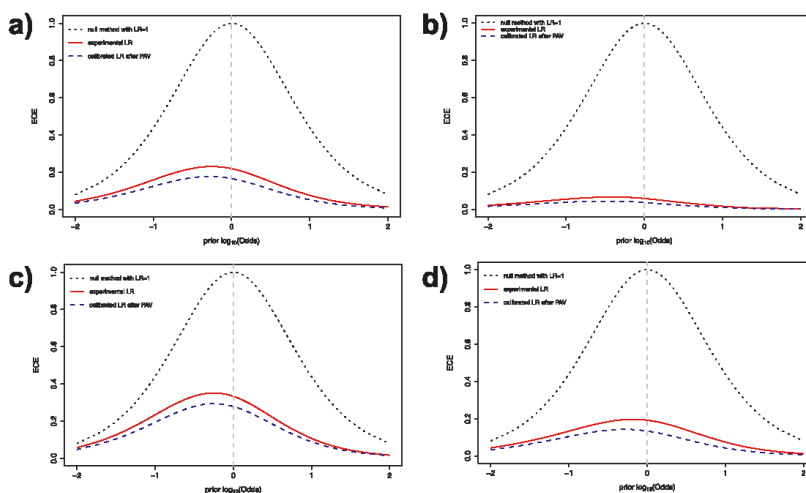


Figure 2. Empirical Cross Entropy (ECE) plots for (a) univariate LR model based on PG7aPB15a for solid car paints (linear interpolation), (b) naive LR model PG7aPB15a_PV23a for solid car paints (linear interpolation), (c) univariate LR model based on PB60b for metallic car paints (spline interpolation) and (d) bivariate LR model PB15dPG7f/PV23c_PB60b for metallic car paints (spline interpolation).

procedure implies that the database, used for the estimation of parameters in the applied LR model, consists of all objects except two being actually compared in the between-objects comparisons (estimation of false positive answers) or one object in the within-object comparisons (estimation of false negative answers).

Results of performed calculations in the form of false positive and false negative LR models responses are presented in Table 4. The performance of each LR model was also evaluated by applying the ECE approach (Figs. 2 and 3).

The best results for solid car paint samples, when univariate LR models were used, were obtained for four variables PG7a, PG7b, PG7aPB15a and PB15cPG7d_2, i.e. values of both false positive and false negative answers were below 10%. According to the ECE plots (Figs. 2 and 3) LR models based only on PG7a and PG7aPB15a most significantly reduce the information loss from 100% to 22% when spectra were reconstructed using linear interpolation. For spline interpolation the best results (reduction of the information loss to less than 28% and low levels of incorrect answers) were obtained for the same models as in linear interpolation method and for one more namely PB15cPG7d_2.

The worst results for solid car paints were generally obtained for the univariate LR models based on PG7e and PB15a. Poor results for PG7e variable may stem from its low area, which value is highly affected at the step of baseline removal. For PB15a variable poor results could be justified as only partial area below the overlying peaks from pigments PG7 (variable PG7a, range 725–744 cm^{-1}) and PB15 (variable PB15a, range 744–765 cm^{-1}) is considered. Therefore, much better results are yielded for the combined variable PG7aPB15a with the area in the range of 725–765 cm^{-1} .

Within univariate LR models proposed for solid car paints evaluation all experimental ECE curves were below the *null* curve (Fig. 2), i.e. there were no cases in which the LR models introduced more misleading information than the neutral method. For the remaining univariate LR models the reduction of information loss was satisfactory and not lower than 36% and 29% when spectra were reconstructed using linear or spline interpolation, respectively.

For metallic car paints the levels of false positive and false negative answers for univariate LR models were generally higher than for solid ones which could be linked with worse quality of spectra recorded for metallic paints. The ECE results (Figs. 2 and 3) also indicate that the LR models are less efficient in their differentiation and have worse performance.

The best results for metallic car paint samples, when univariate LR models were used, were obtained for PB60b and PV23aPB60c variables. The ECE plots confirmed that these two models most significantly reduce the information loss from 100% to 33–38% regardless of the applied reconstruction method. For the remaining variables the uncertainty in the model is higher but does not exceed 60%.

In the case of multivariate data it could be easily observed (Table 4) that in both databases (solid and metallic) levels of false positive answers were generally lower for naive or bivariate LR models than for univariate ones. At the same time levels of false negative answers were similar.

Results of ECE analysis (Fig. 3) showed that the multivariate LR models do not always perform better than the univariate LR models. At the same time, the multivariate naive LR model proposed for solid car paints based on PG7aPB15a and PV23a variables revealed the largest reduction of information loss which exceeded 94% (Fig. 3a). Moreover, bivariate models proposed for solid samples (Figs. 3a and 3b) tend to have worse performance than naive models considering two variables. This tendency was not observed for metallic car paints (Figs. 3c and 3d).

However, LR models proposed for metallic car paints which take into account information about various pigments, e.g. a bivariate model based on PB15dPG7f/PV23c and PV23aPB60c variables satisfactorily reduce the uncertainty about the correct hypothesis after analysing the evidence to less than 31% (Figs. 3c and 3d). At the same time, univariate models which take into account information only on single pigment, i.e. PB15 (variable PB15a), PG7 (variable PG7a1), PV23 (variable PV23b) and PB60 (variable PB60a or PB60b), allowed only to reduce the uncertainty about the correct

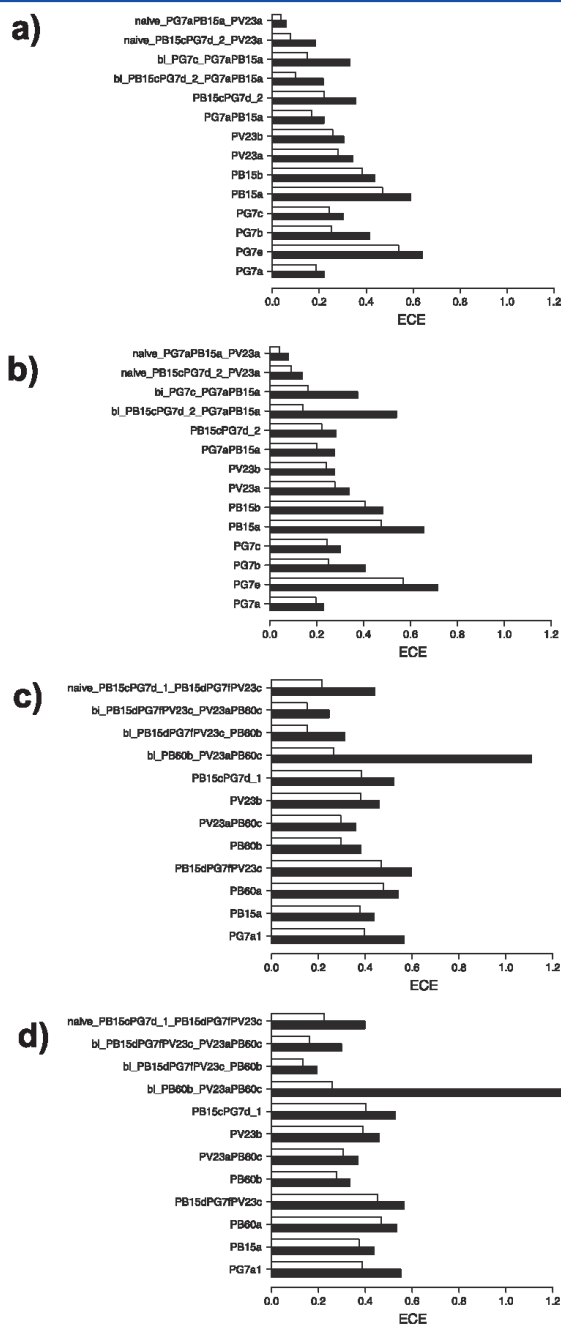


Figure 3. Histograms of C_{lin} and $C_{\text{lin}}^{\text{min}}$ values (description in text) for the LR models proposed for (a) solid car paint spectra reconstructed using linear method, (b) solid car paint spectra reconstructed using spline method, (c) metallic car paint spectra reconstructed using linear method and (d) metallic car paint spectra reconstructed using spline method.

hypothesis after analysing the evidence to ca. 38% and 33% for the best performance (i.e. PB60b) when linear and spline reconstructions were applied. In some cases this value was even higher than 50% (Figs. 3c and 3d). The similar observations hold for the performance of models proposed for solid samples (Figs. 3a and 3b).

Moreover, there are practically no differences between the results of LR models applied for spectra reconstructed using spline or linear interpolation (Table 4 and Fig. 3). This indicates that neither of the methods can be regarded as more effective than the other one. Nevertheless, the linear reconstruction can be viewed as more coarse because of the lack of smoothness between points being linked by linear functions. Splines are much more flexible, because more parameters can be optimised for their construction. Moreover, their shape is also more resembling the shape of continuous curves creating the spectra.

Comparison of a visual and statistical approach of spectra evaluation

For the analysed solid and metallic car paints, the results of the LR approach proved to yield better results than visual comparison of Raman spectra. First the LR test allows for fast and objective discrimination of paint in which, in contrary to visual examination, the false negative rates could be included. Moreover, most of the samples that spectra were initially visually indistinguishable (giving false positive answers) turned out to show differences for at least one LR model. Most univariate and all multivariate models (both naïve and bivariate) gave better results than visual interpretation (Tables 2, 4 and Table S2 (Supporting Information)). There were also no cases in which samples were visually distinguished but all LR results indicated otherwise.

Moreover, statistical comparison of individual spectra measured for the same sample showed that variation between replicates is small; however, there are some false negative LR model responses.

The multivariate LR models do not seem to improve the results concerning the number of false negative answers, but results of ECE analysis showed that the strength for the correct hypothesis is slightly greater. However, in authors attitude including false negative rates is still better than to skip this information in visual comparison of spectra.

Conclusions

The likelihood ratio approach was applied to solve the comparison problem of solid and metallic blue car paints. Such an approach, which is a statistical tool for evaluating the evidential value of analytical data obtained for e.g. microtraces, was a step further, as until now comparative analysis of car paints was carried out visually with the aim of finding any similarities and discrepancies.

It appeared that wavelet transform may be useful for eliminating the baseline drift caused by fluorescence. It also made it more convenient to propose the areas under particular important bands of pigments in the Raman spectra to act as variables that may be suitable indicators of common or different sources of the analysed car paints. This enabled one to reduce the Raman spectra dimensionality by up to 10 significant features taking into account the most relevant information about pigments the samples contain. Univariate, naïve and bivariate LR models proposed for the analysed car paints yielded low rates of false positive and false negative answers (for many models lower than 10%).

For solid car paints the rates of false positive and false negative answers were the lowest for the naïve LR model based on variables

corresponding with areas under peaks for pigments named PG7, PB15 and PV23 (the areas were computed for selected bands covering the ranges 725–765 and 1370–1415 cm^{-1}). For metallic car paints the best results were yielded for the bivariate LR models based on areas under peaks of pigments named PV23, PB60, PB15 and PG7 (1333–1350 and 1370–1415 cm^{-1}). ECE plots confirmed that their performance was very good with reduction of information loss reaching more than 90%.

No significant differences between the results of LR models applied for spectra reconstructed using spline or linear interpolation were observed. As a consequence neither of the methods seems to be more credible. Nevertheless, the mathematical background of the linear and spline interpolation indicates that the latter one is much more flexible as it fits the curves more resembling the shape of spectra than the coarse linear functions do.

Acknowledgements

Research was financially supported by the Institute of Forensic Research, Krakow, Poland within the project no. VI/K 2013-2014. The authors wish to thank Mr. Colum McCarthy, Scottish Police Authority, Forensic Services, Glasgow, UK for helpful comments and language support.

References

- [1] B. Caddy, *Forensic Examination of Glass and Paint: Analysis and Interpretation*, Taylor & Francis, New York, **2001**.
- [2] W. Stoecklein, in *Forensic Examination of Glass and Paint: Analysis and Interpretation*, (Ed: B. Caddy), Taylor & Francis, New York, **2001**, pp. 150–170.
- [3] E. M. Suzuki, *J. Forensic. Sci.* **1996**; *41*, 376.
- [4] E. M. Suzuki, *J. Forensic. Sci.* **1996**; *41*, 393.
- [5] K. Flynn, R. O'Leary, C. Lennard, C. Roux, B. J. Reedy, *J. Forensic. Sci.* **2005**; *50*, 832.
- [6] B. Kanngießer, W. Malzer, A. F. Rodriguez, I. Reiche, *Spectrochim. Acta Part B* **2005**; *60*, 41.
- [7] J. Zięba-Palus, R. Borusiewicz, *J. Mol. Struct.* **2006**; *286*, 792.
- [8] T. L. Beam, W. V. Willis, *J. Forensic. Sci.* **1990**; *35*, 1055.
- [9] B. M. Trzcńska, J. Zięba-Palus, P. Kościelniak, *J. Mol. Structure* **2009**; *393*, 924.
- [10] A. H. Kuptsov, *J. Forensic. Sci.* **1994**; *39*, 305.
- [11] E. M. Suzuki, M. Carabba, *J. Forensic. Sci.* **2001**; *46*, 1053.
- [12] J. de Gelder, P. Vandenabeele, F. Govaert, L. Moens, *J. Raman Spectrosc.* **2005**; *36*, 1059.
- [13] J. Zięba-Palus, A. Michalska, A. Weselucha-Birczyńska, *J. Mol. Struct.* **2011**; *993*, 134.
- [14] J. Zięba-Palus, J. Wąs-Gubała, *J. Mol. Struct.* **2011**; *993*, 127.
- [15] J. Zięba-Palus, A. Michalska, *J. Forensic. Sci.* **2014**, *59*, 943.
- [16] G. Massonnet, W. Stoecklein, *Sci. Justice* **1999**; *39*, 181.
- [17] M. Skenderovska, B. Minčeva-Šukarova, L. Andreeva, *Maced. J. Chem. Chem. Eng.* **2008**; *27*, 9.
- [18] P. Buzzini, G. Massonnet, F. M. Sermier, *J. Raman Spectrosc.* **2006**; *37*, 922.
- [19] J. Zięba-Palus, B. M. Trzcńska, *J. Forensic. Sci.* **2013**; *58*, 1359.
- [20] C. Aitken, F. Taroni, *Statistics and the Evaluation of Evidence for Forensic Scientists*, Wiley, Chichester, **2004**.
- [21] G. Zadora, A. Martyna, D. Ramos, C. Aitken, *Statistical Analysis in Forensic Science. Evidential value of multivariate physicochemical data*, Wiley, Chichester, **2014**.
- [22] C. Aitken, D. Lucy, *Appl. Stat.* **2004**; *53*, 109.
- [23] C. Muehlethaler, G. Massonnet, M. Devitner, M. Bradley, A. Herrero et al, *Forensic. Sci. Int.* **2013**; *229*, 80.
- [24] N. Navas, J. Romero-Pastor, E. Manzano, C. Cardell, *J. Raman Spectrosc.* **2010**; *41*, 1486.
- [25] C. Muehlethaler, G. Massonnet, P. Esseiva, *Forensic. Sci. Int.* **2011**; *209*, 173.

- [26] C. Defeyt, J. Van Pevenage, L. Moens, D. Strivay, P. Vandenabeele, *Spectrochim. Acta Part A* **2013**; *115*, 636.
- [27] I. Daubechies, *IEEE T. Inform. Theory* **1990**; *36*, 961.
- [28] B. Walczak (Ed), *Wavelets in Chemistry*. Elsevier, Amsterdam, **2000**.
- [29] A. Wee, D. B. Grayden, Y. Zhu, K. Petkovic-Duran, D. Smith, *Electrophoresis* **2008**; *29*, 4215.
- [30] Y. N. Subbotin, in *Encyclopedia of Mathematics*, (Ed: M. Hazewinkel), Springer, **2001**.
- [31] B. W. Silverman, *Density Estimation for Statistics and Data Analysis*. Chapman & Hall, London, **1986**, pp. 86-87.
- [32] N. Brümmner, J. du Preez, *Comput. Speech Lang.* **2006**; *20*, 230.
- [33] D. Ramos, J. Gonzalez-Rodriguez, G. Zadora, *J Forensic. Sci.* **2013**; *58*, 1503.
- [34] M. Ayer, H. D. Brunk, G. M. Ewing, W. T. Reid, E. Silverman, *Ann. Math. Stat.* **1955**; *26*, 41.
- [35] R Core Team, *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, **2012**.
- [36] J. Whittaker, *Graphical Models in Applied Multivariate Statistics*. Wiley, Chichester, **1990**.
- [37] C. Aitken, G. Zadora, D. Lucy, *J. Forensic. Sci.* **2007**; *52*, 412.

Supporting information

Additional supporting information may found in the online version of this article at publisher's web site.

Kraków, dnia 28 sierpnia 2017 r.

Oświadczenie

Oświadczam, iż w publikacji *Application of a likelihood ratio approach in solving a comparison problem of Raman spectra recorded for blue automotive paints* opublikowanej w Journal of Raman Spectroscopy, 46 (2015) 772-783 mój udział polegał na:

- współpracy w formułowaniu hipotezy badawczej,
- zaproponowaniu jednej z metod rekonstrukcji widm w celu umożliwienia konstrukcji modeli ilorazu wiarygodności,
- przeprowadzeniu stosownych obliczeń ilorazu wiarygodności dla ustalonych zmiennych,
- współpracy w ocenie i interpretacji wyników,
- współtworzeniu publikacji i formułowaniu odpowiedzi na recenzje.

dr Agnieszka Martyna

Zakład Chemii Analitycznej
Instytut Chemii
Uniwersytet Śląski w Katowicach
ul. Szkolna 9, 40-003 Katowice

INSTYTUT EKSPERTYZ SĄDOWYCH

im. Prof. dra Jana Sehna

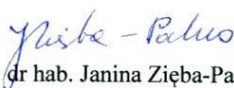
PL 31-033 Kraków, ul. Westerplatte 9
tel. (+48 12) 61 85 700, fax (+48 12) 422 38 50
e-mail: ies@ies.krakow.pl

Kraków, dnia 23 sierpnia 2017 r.

Oświadczenie

Oświadczam, iż w publikacji *Application of a likelihood ratio approach in solving a comparison problem of Raman spectra recorded for blue automotive paints* opublikowanej w *Journal of Raman Spectroscopy*, 46 (2015) 772-783 mój udział polegał na:

- dokonaniu korekty artykułu,
- weryfikacji treści odpowiedzi na recenzje.


prof. dr hab. Janina Zięba-Palus

Instytut Ekspertyz Sądowych
im. Prof. dra Jana Sehna w Krakowie
ul. Westerplatte 9, 31-033 Kraków

INSTYTUT EKSPERTYZ SĄDOWYCH

im. Prof. dra Jana Sehna

PL 31-033 Kraków, ul. Westerplatte 9
tel. (+48 12) 61 85 700, fax (+48 12) 422 38 50
e-mail: ics@ics.krakow.pl

Kraków, dnia 23 sierpnia 2017 r.

Oświadczenie

Oświadczam, iż w publikacji *Application of a likelihood ratio approach in solving a comparison problem of Raman spectra recorded for blue automotive paints* opublikowanej w Journal of Raman Spectroscopy, 46 (2015) 772-783 mój udział polegał na:

- współpracy w formułowaniu hipotezy badawczej,
- ustaleniu ogólnej koncepcji badań,
- merytorycznym nadzorze procesu przygotowania publikacji,
- zaproponowaniu jednej z metod rekonstrukcji widm w celu umożliwienia konstrukcji modeli ilorazu wiarygodności,
- współpracy w ocenie i interpretacji wyników,
- pomocy przy tworzeniu publikacji, w procesie redakcyjnym i formułowaniu odpowiedzi na recenzje.



dr hab. Grzegorz Zadora, prof. IES
Instytut Ekspertyz Sądowych
im. Prof. dra Jana Sehna w Krakowie
ul. Westerplatte 9, 31-033 Kraków

Zakład Chemii Analitycznej
Instytut Chemii
Uniwersytet Śląski w Katowicach
ul. Szkolna 9, 40-003 Katowice

INSTYTUT EKSPERTYZ SĄDOWYCH

im. Prof. dra Jana Sehna

PL 31-033 Kraków, ul. Westerplatte 9
tel. (+48 12) 61 85 700, fax (+48 12) 422 38 50
e-mail: ics@ics.krakow.pl

Kraków, dnia 23 sierpnia 2017 r.

Oświadczenie

Oświadczam, iż w publikacji *Application of a likelihood ratio approach in solving a comparison problem of Raman spectra recorded for blue automotive paints* opublikowanej w Journal of Raman Spectroscopy, 46 (2015) 772-783 mój udział polegał na:

- współpracy w sformułowaniu hipotezy badawczej,
- przeprowadzeniu analiz lakierów samochodowych z wykorzystaniem spektrometrii ramanowskiej,
- zaplanowaniu i wykonaniu eksperymentów oraz interpretacji wyników związanych z wizualnym porównaniem widm,
- wyborze zmiennych do obliczeń statystycznych posiadających odpowiedni kontekst chemiczny,
- weryfikacji efektywności zaproponowanej metodologii interpretacji wyników,
- współudziale w interpretacji uzyskanych wyników,
- współudziale w tworzeniu publikacji i formułowaniu odpowiedzi na recenzje.

Aleksandra Michalska

Instytut Ekspertyz Sądowych
im. Prof. dra Jana Sehna w Krakowie
ul. Westerplatte 9, 31-033 Kraków

Publikacja 4

Tytuł:	Interpretation of FTIR spectra of polymers and Raman spectra of car paints by means of likelihood ratio approach supported by wavelet transform for reducing data dimensionality
Autorzy:	Martyna A., Michalska A. , Zadora G.
Czasopismo:	<i>Analytical and Bioanalytical Chemistry</i>
Wartość <i>Impact Factor</i> :	3,436
Punkty MNiSW:	40
Cytowana w rozprawie jako:	Martyna i in. 2015

Anal Bioanal Chem (2015) 407:3357–3376
DOI 10.1007/s00216-015-8558-9

RESEARCH PAPER

Interpretation of FTIR spectra of polymers and Raman spectra of car paints by means of likelihood ratio approach supported by wavelet transform for reducing data dimensionality

Agnieszka Martyna · Aleksandra Michalska ·
Grzegorz Zadora

Received: 14 November 2014 / Revised: 23 January 2015 / Accepted: 10 February 2015 / Published online: 11 March 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract The problem of interpretation of common provenance of the samples within the infrared spectra database of polypropylene samples from car body parts and plastic containers as well as Raman spectra databases of blue solid and metallic automotive paints was under investigation. The research involved statistical tools such as likelihood ratio (LR) approach for expressing the evidential value of observed similarities and differences in the recorded spectra. Since the LR models can be easily proposed for databases described by a few variables, research focused on the problem of spectra dimensionality reduction characterised by more than a thousand variables. The objective of the studies was to combine the chemometric tools easily dealing with multidimensionality with an LR approach. The final variables used for LR models' construction were derived from the discrete wavelet transform (DWT) as a data dimensionality reduction technique supported by methods for variance analysis and corresponded with chemical information, i.e. typical absorption bands for polypropylene and

peaks associated with pigments present in the car paints. Univariate and multivariate LR models were proposed, aiming at obtaining more information about the chemical structure of the samples. Their performance was controlled by estimating the levels of false positive and false negative answers and using the empirical cross entropy approach. The results for most of the LR models were satisfactory and enabled solving the stated comparison problems. The results prove that the variables generated from DWT preserve signal characteristic, being a sparse representation of the original signal by keeping its shape and relevant chemical information.

Keywords Raman spectroscopy of blue car paints · FTIR spectrometry of polymers · Data dimensionality reduction · Wavelet transform · Comparison problem · Likelihood ratio

Introduction

In events such as car accidents, various kinds of traces are generated, including glass fragments from windshields, pieces of car paints or fragments of polymers from plastic car body parts (bumpers or headlamp lenses) and other materials [9, 29]. In most cases, they are very small (with linear dimensions less than 0.5 mm) and therefore they are referred to as microtraces. The microtraces play an important role as due to their small sizes, they can be transferred and retained on the clothes of the event participants or objects connected with the event. All microtraces constitute unique evidence samples, which are indispensable for making inferences about the event.

The question that a forensic expert or any other person having special knowledge in a particular field (e.g. interpretation of spectroscopic data) may be asked concerns whether

A. Martyna
Faculty of Chemistry, Department of Analytical Chemistry,
Jagiellonian University in Krakow, Ingardena 3,
30-060, Krakow, Poland
e-mail: rzepecka@chemia.uj.edu.pl

A. Michalska · G. Zadora (✉)
Institute of Forensic Research in Krakow,
Westerplatte 9, 31-033 Krakow, Poland
e-mail: gzadora@ies.krakow.pl

A. Michalska
e-mail: amichalska@ies.krakow.pl

G. Zadora
Institute of Chemistry, Chemometric Research Group, University
of Silesia in Katowice, Szkolna 9, 40-006, Katowice, Poland

the microtraces, e.g. polymer fragments or car paints chips recovered from car accident victim's clothes (known as recovered sample), are similar to those collected from the questioned car (known as control sample). This concerns determining whether they may or may not come from the same source, e.g. a bumper or car paint layer of a questioned car. This is a problem that is frequently encountered in forensic science, known as a comparison problem [26, 28, 29]. Its solution may be helpful for a fact finder (e.g. policemen, judges, prosecutors) aiming at establishing the connection between the suspected car and the victim. Such problem can be solved by comparing the physicochemical data gathered using various analytical methods, describing the compared objects [29].

Any type of physicochemical data can be analysed for forensic purposes. The only limitation and difference between routine analytical analyses is that the utilised methods should be non-destructive for evidence samples analyses. Main spectroscopic techniques which are usually applied in such analyses are Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and Raman spectroscopy (RS). Both techniques deliver information about molecular structure of compounds being present in the analysed object. However, for coloured samples, FTIR is usually applied for describing their polymer composition while Raman spectroscopy is used for gaining information mainly about pigments composition responsible for colour and shade of analysed objects. Both techniques deliver samples characteristics in the form of spectra. Due to their easily comprehended graphical form, it became a common procedure to solve the comparison problem of polymers or car paints in the visual way by overlying the spectra and detecting the similarities and differences in the bands location, shape, width and other characteristics. Even though this method proves to be sufficient in the case when the compared spectra are visually distinguishable, it lacks the objectivity if spectra are similar. What is more, such visual comparison does not deliver any information about the evidence value of the observed similarities and differences, which is crucial from the forensic point of view.

Such subjectivity does not appear when comparing the physicochemical data, e.g. spectra in numerical form, instead of graphical form, which interpretation is supported by multivariate data analysis using chemometric and statistical tools. The only handicap of such an approach is that highly multidimensional data are still difficult to interpret using statistical methods [29]. There are many examples of applying the chemometrics in spectra interpretation, e.g. in disease diagnostics or metabolomics [12, 13]. However, the problem of spectra interpretation for forensic purposes is not extensively described.

Any scientist may be asked to provide an information about the evidential value of the evidence subjected to the analysis. Therefore, this seems to be not only a domain of forensic experts but also any person having a special knowledge in particular field. The clue for reporting the conclusions to the court lies in the way the data are interpreted. One of the statistical methods for giving an objective answer to the question—*may the compared samples (known as recovered and control objects) come from the same source?*—is the likelihood ratio theory of hypothesis testing (LR) [1, 2, 26–29]. Likelihood ratio compares the data measured for the evidence (E; e.g. spectral data in the numerical form) in view of two contrasting perspectives, that of prosecutor (H_1) and defense (H_2):

$$LR = \frac{Pr(E|H_1)}{Pr(E|H_2)}, \quad (1)$$

where H_1 —proposition stating that compared recovered and control samples come from the same source, H_2 —proposition stating that compared recovered and control samples come from different sources.

Thus values of LR above 1 support H_1 , while values of LR less than 1 support H_2 . A value of LR equal to 1 does not provide any support for neither of the propositions. The advantage of LR approach is that it delivers information about the strength of support towards one of the hypotheses. The larger (lower) the value of LR, the stronger the support for H_1 (H_2).

LR approach enables for taking into account the following aspects in a single calculation run:

- (a) The similarity of the recovered material and the control sample
- (b) Information about the rarity of the determined physicochemical characteristics (e.g. absorbance or Raman scattering intensity measurements) for recovered and/or control samples in the relevant population
- (c) Possible sources of uncertainty (sources of error) which should include at least
 - Variation of the measurements of characteristics within the recovered and/or control items
 - Variation of the measurements of characteristics between various objects in the relevant population (e.g. polymers or car paints population),
- (d) The level of association (correlation) between different characteristics when more than one characteristic has been measured.

Taking into account the rarity information is what distinguishes the LR approach from inferencing using the significance tests such as, e.g. *t* test [29]. The value of the observed similarity between physicochemical data is far greater when the rare characteristics are similar than when the similarity is observed between commonly detected features.

Till now, the LR models have been applied for evidence evaluation only in situations when the number of objects in the database (m) extended the number of the variables (p) describing them ($m \gg p$) [17, 27, 28]. The problem emerges in the case of highly multivariate data such as spectra stored in the numerical form, for which the situation is opposite ($m \ll p$). This is because when using statistical methods (e.g. LR approach) for multidimensional data, it is indispensable to use huge database to reliably estimate the relevant parameters of the population [26, 29]. Such databases should consist of m objects, which number is far greater than the number of parameters (p) they are described by. When working with spectra databases it is impossible to analyse the number of samples that greatly extends the number of the measured parameters as, e.g. absorbance or Raman scattering intensity measured by particular wavenumbers. Then the obvious solution to this problem may be reducing the number of the relevant parameters (variables) that are indispensable for sufficient description of the characteristics for the limited number of the analysed samples.

It is widely known that chemometric methods such as principal component analysis (PCA) enable for the most efficient data compression without losing too much information. It is therefore a natural way to use them for data dimensionality reduction. However, most of them do not account for many aspects, which are required from the forensic perspective (e.g. the rarity information). This in turn is addressed in the statistical methods, including LR approach. Therefore, it becomes natural to combine the advantage of the chemometrics abilities to reduce data dimensionality with the LR models meeting the requirements of forensic evidence evaluation. Therefore, the paramount objective of the studies was the attempt to apply the LR approach for the multivariate data by proposing the appropriate data compressing technique that is capable of extracting the most suitable information for solving the comparison problem of polymer samples described by FTIR spectra and car paints described by Raman spectra.

Within the LR approach, the most straightforward idea when dealing with multivariate data is to use the naïve LR model neglecting the correlation between the variables (e.g. in spectra, single data points may act as variables). Then each of the variables is treated independently and the results of individual univariate LR models are multiplied

to give an overall result. Since the assumption of the lack of correlation between variables is seldom true, in many cases, such a naïve approach provides overpessimistic or overoptimistic outcomes. To deal with such a problem the application of graphical models was also reported [3, 28, 29], which are a tool for splitting the multidimensional problem into several problems with lower dimensionality. However, graphical models work efficiently only up to several variables [28].

PCA, despite of being effective in data compression, has some limitations. Firstly, it requires a huge dataset for building the appropriate and reliable model and each new sample affects the PCA space. This should be overcome by using some other methods which reduce the data dimensionality independently of the whole database, which means have local properties for each observation.

In this research, wavelet transform (WT) was proposed as a useful tool for compressing the dimensionality of spectra for further purposes such as, e.g. comparative analysis. Its great advantage lies in the transformation of each spectrum independently of the whole database. This means that in contrary to PCA, which is orthogonal transform in respect for the whole database, WT is an orthogonal transformation for each spectrum. The method focuses on the local spectra features as, e.g. bands associated with particular bond vibrations, especially important from the chemical perspective. Limiting the relevant spectra features to those extracted from wavelet transform may prove to preserve sufficient information for solving the comparison problem of spectra using the LR approach. Wavelets [11] have become invaluable tool in images and signals processing. There are many literature reports concerning their application within chemistry field such as infrared spectrometry, mass spectrometry or chromatography, etc. [4, 10, 22]. Even though in chemometrics data compressing methods, e.g. wavelet transform, have been developed and are still being improved, there are no reports of using them in the problems occurring for evaluating the evidential value of multidimensional physicochemical data for forensic purposes.

Materials and methods

Samples and equipment

Twelve samples of polypropylene (containing also some other compounds such as polyethylene) used for car body elements production (e.g. bumpers, headlamp lenses) were the subject of the Fourier transform infrared spectrometry (FTIR) analysis. Since polymers are common materials used in our daily lives, it is likely for the other plastics to occur

at the scene of a car accident. For this reason, 15 additional package polypropylene samples were subjected to the FTIR analysis as well. The equipment used was FTS 40Pro Fourier transform infrared spectrometer (Bio-Rad/Digilab, Marlborough, MA), coupled with a UMA 500 microscope. For each of the 27 samples, 3 FTIR spectra in the transmission mode were collected from 4 distinct parts of the samples (with a total of $n = 12$ measurements per sample).

Thirty solid and 30 metallic blue car paints originating from bodies of damaged cars were subjected to Raman spectroscopy using a Renishaw inVia spectrometer equipped with a confocal Leica microscope and near infrared semiconductor laser (785 nm) as an excitation source. The laser beam was focused on samples by 50x (N.A.=0.75) objective lens, which gives a theoretical spot size of approximately 2 μm . The spectrometer collected light in the back-scattering mode, which was dispersed on a 1200 grooves/mm grating and was focused on a Peltier-cooled charged coupled device (CCD). Spectral data was processed with Renishaw Wire 3.2 software. Spectra of all samples were recorded in situ in the region of 200–2500 cm^{-1} (for the purpose of the calculations within this research the spectrum range was limited to 200–2300 cm^{-1}) with an acquisition time of 10 s and collection of five accumulations. The laser power applied while recording Raman spectra used 1 or 0.5 % of its maximum power (300 ± 30 mW). Each paint sample was measured at least in three spots (maximum number of seven spots).

Likelihood ratio

Computing the LR [1, 2, 29] requires the appropriate databases with the measurements of objects from the relevant population, e.g. of polymer samples or car paints, for reliable estimation of the within- and between-object variability and the rarity of the observed data. Therefore, all the spectra must be transformed into the numerical form presenting the signal intensities for particular wavenumbers measured for each sample.

Each of the three databases consists of m objects (for FTIR spectra it is $m = 27$, for solid and metallic Raman spectra databases $m = 30$), each measured n_i times (n_i is constant, $n = 12$, for FTIR spectra database and differs between 3 and 7 in Raman spectra databases) and described by p variables. Finally, polymers database is a matrix of size 324 spectra \times 2048 variables (signal intensities measured by wavenumbers), solid car paints Raman spectra database is a matrix of size 100 \times 1024 and the metallic car paints Raman spectra database is a matrix of size 97 \times 1024. Each j th observation ($j = 1, \dots, n_i$) for the i th ($i = 1, \dots, m$) object from the database is given in the form of p -vector:

$$\mathbf{x}_{ij} = (x_{ij1}, \dots, x_{ijp})^T,$$

where $i = 1, \dots, m$ and $j = 1, \dots, n_i$.

The distribution of \mathbf{x}_{ij} , given $\bar{\mathbf{x}}_{i..}$ is characterised by the within-object variance \mathbf{U} that is for all objects equal and assumed normal: $(\mathbf{x}_{ij}|\bar{\mathbf{x}}_{i..}, \mathbf{U}) \sim N(\bar{\mathbf{x}}_{i..}, \mathbf{U})$.

The within-object variance-covariance estimate (\mathbf{U}) is expressed by:

$$\hat{\mathbf{U}} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^m \frac{n_i}{n_i - 1} \mathbf{S}_{wi}, \quad (2)$$

where:

$$\mathbf{S}_{wi} = \sum_{j=1}^{n_i} (\mathbf{x}_{ij} - \bar{\mathbf{x}}_{i..}) (\mathbf{x}_{ij} - \bar{\mathbf{x}}_{i..})^T.$$

The mean vector of p variables for each object is given as $\bar{\mathbf{x}}_{i..} = \frac{1}{n_i} \sum_{j=1}^{n_i} \mathbf{x}_{ij}$, and its distribution describes the between-object variability (\mathbf{C}). It can be assumed normal $(\bar{\mathbf{x}}_{i..}|\mu, \mathbf{C}) \sim N(\mu, \mathbf{C})$ or is estimated by kernel density estimation procedure using Gaussian kernels with bandwidth parameter calculated as $h = \left(\frac{4}{m(2p+1)}\right)^{\frac{1}{p+4}}$ [21].

The between-object variance-covariance estimate (\mathbf{C}) is expressed as:

$$\hat{\mathbf{C}} = \frac{N}{N^2 - \sum_{i=1}^m n_i^2} (\mathbf{S}_b - (m-1)\hat{\mathbf{U}}), \quad (3)$$

where:

$$\mathbf{S}_b = \sum_{i=1}^m n_i (\bar{\mathbf{x}}_{i..} - \bar{\mathbf{x}}_{...}) (\bar{\mathbf{x}}_{i..} - \bar{\mathbf{x}}_{...})^T.$$

The overall mean μ is estimated from $\bar{\mathbf{x}}_{...} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^m n_i \bar{\mathbf{x}}_{i..}$, where $N = \sum_{i=1}^m n_i$.

The measurements recorded for objects from the database are used for estimating the relevant parameters such as means, variances and covariances while constructing the LR models. Such LR models can then be applied for comparing the objects known as recovered and control samples.

For control object \mathbf{y}_1 there are k_1 observations of the p variables:

$$\mathbf{y}_{1j} = (y_{1j1}, \dots, y_{1jp})^T$$

with mean vector $\bar{\mathbf{y}}_1 = \frac{1}{k_1} \sum_{j=1}^{k_1} \mathbf{y}_{1j}$, which comes from normal distribution $(\bar{\mathbf{y}}_1|\mu, \mathbf{U}, \mathbf{C}) \sim N\left(\mu, \frac{\mathbf{U}}{k_1} + \mathbf{C}\right)$.

For recovered object \mathbf{y}_2 , there are k_2 observations of the p variables:

$$\mathbf{y}_{2j} = (y_{2j1}, \dots, y_{2jp})^T$$

with mean vector $\bar{\mathbf{y}}_2 = \frac{1}{k_2} \sum_{j=1}^{k_2} \mathbf{y}_{2j}$, which comes from normal distribution $(\bar{\mathbf{y}}_2|\mu, \mathbf{U}, \mathbf{C}) \sim N\left(\mu, \frac{\mathbf{U}}{k_2} + \mathbf{C}\right)$.

The weighted mean of $\bar{\mathbf{y}}_1$ and $\bar{\mathbf{y}}_2$ is $\bar{\mathbf{y}}^* = \frac{k_1\bar{\mathbf{y}}_1 + k_2\bar{\mathbf{y}}_2}{k_1 + k_2}$ and comes from normal distribution $(\bar{\mathbf{y}}^*|\mu, \mathbf{U}, \mathbf{C}) \sim N\left(\mu, \frac{\mathbf{U}}{k_1 + k_2} + \mathbf{C}\right)$.

In the LR numerator, it is assumed that the compared samples originate from the same object (H_1). Thus, it can be shown that the numerator can be expressed by explicitly taking into account the evaluation of the difference of physicochemical data between compared objects, as well as their rarity, the latter being expressed by the distance of the weighted mean $\bar{\mathbf{y}}^*$ from the overall mean $\bar{\mathbf{x}}_{..}$ estimated from the database.

Therefore, the numerator could be expressed by [1, 2, 29]:

$$\begin{aligned} f(\bar{\mathbf{y}}_1, \bar{\mathbf{y}}_2|\mathbf{U}, \mathbf{C}, \bar{\mathbf{x}}_{..}, H_1) &= f(\bar{\mathbf{y}}_1 - \bar{\mathbf{y}}_2|\mathbf{U}, H_1) \times \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m K(\bar{\mathbf{y}}^*|\bar{\mathbf{x}}_{..}, \mathbf{U}, \mathbf{C}, h, H_1) \\ &= (2\pi)^{-p/2} \left| \frac{\mathbf{U}}{n_1} + \frac{\mathbf{U}}{n_2} \right|^{-\frac{1}{2}} \exp \left\{ -\frac{1}{2} (\bar{\mathbf{y}}_1 - \bar{\mathbf{y}}_2)^T \left(\frac{\mathbf{U}}{n_1} + \frac{\mathbf{U}}{n_2} \right)^{-1} (\bar{\mathbf{y}}_1 - \bar{\mathbf{y}}_2) \right\} \\ &\quad \times (2\pi)^{-p/2} \left| \frac{\mathbf{U}}{k_1 + k_2} + h^2 \mathbf{C} \right|^{-\frac{1}{2}} \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m \exp \left\{ -\frac{1}{2} (\bar{\mathbf{y}}^* - \bar{\mathbf{x}}_{..})^T \left(\frac{\mathbf{U}}{k_1 + k_2} + h^2 \mathbf{C} \right)^{-1} \right. \\ &\quad \left. \times (\bar{\mathbf{y}}^* - \bar{\mathbf{x}}_{..}) \right\}. \end{aligned} \quad (4)$$

In the denominator of the likelihood ratio, $\bar{\mathbf{y}}_1$ and $\bar{\mathbf{y}}_2$ are taken to be independent as the data are assumed to originate from different objects (H_2). Then, it could be expressed by [1, 2, 29]:

$$\begin{aligned} f(\bar{\mathbf{y}}_1, \bar{\mathbf{y}}_2|\mathbf{U}, \mathbf{C}, \bar{\mathbf{x}}_{..}, H_2) &= \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m f(\bar{\mathbf{y}}_1|\bar{\mathbf{x}}_{..}, \mathbf{U}, \mathbf{C}, h, H_2) \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m f(\bar{\mathbf{y}}_2|\bar{\mathbf{x}}_{..}, \mathbf{U}, \mathbf{C}, h, H_2) \\ &= (2\pi)^{-p/2} \left| \frac{\mathbf{U}}{k_1} + h^2 \mathbf{C} \right|^{-\frac{1}{2}} \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m \exp \left\{ -\frac{1}{2} (\bar{\mathbf{y}}_1 - \bar{\mathbf{x}}_{..})^T \left(\frac{\mathbf{U}}{k_1} + h^2 \mathbf{C} \right)^{-1} (\bar{\mathbf{y}}_1 - \bar{\mathbf{x}}_{..}) \right\} \\ &\quad \times (2\pi)^{-p/2} \left| \frac{\mathbf{U}}{k_2} + h^2 \mathbf{C} \right|^{-\frac{1}{2}} \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m \exp \left\{ -\frac{1}{2} (\bar{\mathbf{y}}_2 - \bar{\mathbf{x}}_{..})^T \left(\frac{\mathbf{U}}{k_2} + h^2 \mathbf{C} \right)^{-1} (\bar{\mathbf{y}}_2 - \bar{\mathbf{x}}_{..}) \right\}. \end{aligned} \quad (5)$$

In the case of univariate data, all matrices or vectors become scalars, e.g. \mathbf{U} becomes u^2 and $\bar{\mathbf{x}}_{..}$ is reduced to \bar{x} .

Assessing the LR models performance—empirical cross entropy

Any statistical or chemometric methods used for data interpretation should be controlled whether they deliver correct results. The most trivial way to assess the models performance is by estimating the levels of incorrect answers (i.e. false positive and false negative rates) by considering two types of computational experiments [29]:

- (1) Each two of the m analysed objects are compared to determine the LR value. Since they constitute two different objects, H_2 should be supported (hence $LR < 1$) and each value supporting the H_1 ($LR > 1$) is known as the false positive answer. Total number of the comparisons performed in this experiment for a

database of m objects is given as $N_2 = \binom{m}{2} = \frac{m!}{2!(m-2)!} = \frac{m \cdot (m-1)}{2}$;

- (2) LR is computed for two samples coming from the same object. The samples are created by dividing all measurements for each sample into two parts. If the number of the measured spectra for the sample was even, both parts were equinumerous. Otherwise, the first part (e.g. acting as control sample) had one spectrum more than the second (recovered sample). For example for five spectra describing a sample, the control sample consisted of three spectra and the recovered sample of two spectra. The correct model response should support H_1 (hence $LR > 1$). Each value of $LR < 1$ is then a false negative answer. The number of comparisons performed within this experiment is then N_1 , which equals to a number of samples in the database ($N_1 = m$).

When considering only the levels of false positive and false negative answers, the information concerning the strength of the support for particular hypothesis is hidden. Therefore, such an information is usually insufficient for assessing the performance of the LR models. This is because it is not only desired for LR models to support the correct hypothesis but also this support should be as strong as possible (i.e. $LR \gg 1$ when H_1 is correct and $LR \ll 1$ when H_2 is correct). If an incorrect hypothesis is supported by LR value (i.e. $LR < 1$ when H_1 is true and $LR > 1$ when H_2 is true) then LR value should concentrate around 1, supporting the incorrect hypothesis very weakly. Such way of thinking is justified by Bayesian theory (6), which assigns the crucial role for the LR values as they modify the prior assumptions ($\Pr(H_1)$ and $\Pr(H_2)$) about the evidence stated before its analysis to give posterior probabilities in the form of ratio of conditional probabilities $\Pr(H_1|E)$ and $\Pr(H_2|E)$.

$$\frac{\Pr(H_1)}{\Pr(H_2)} \cdot \frac{\Pr(E|H_1)}{\Pr(E|H_2)} = \frac{\Pr(H_1)}{\Pr(H_2)} \cdot LR = \frac{\Pr(H_1|E)}{\Pr(H_2|E)}. \quad (6)$$

One of the methods for assessing the LR models performance combining the values of LR, prior and posterior probabilities is empirical cross entropy (ECE) [8, 19, 20, 27, 29]. It is a method based upon the system of rewarding and penalising the obtained LR values. The LR models responses that support the incorrect hypothesis are penalised by involving logarithmic strictly proper scoring rules (Fig. 1a). The higher the support for the incorrect hypothesis, the greater penalty is assigned to the model's response:

- (a) if H_1 is true: $-\log_2 \Pr(H_1|E)$,
- (b) if H_2 is true: $-\log_2 \Pr(H_2|E)$.

The overall penalty rate is calculated as the weighted average of all values of penalties assigned to LR models

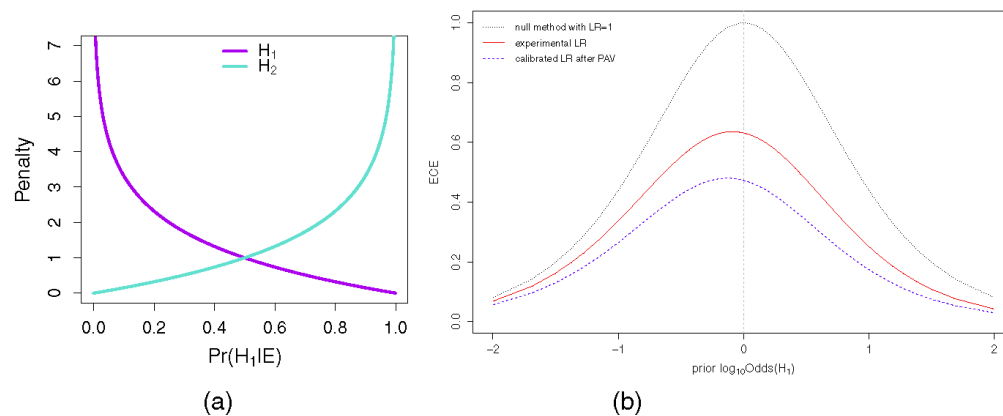


Fig. 1 a Logarithmic strictly proper scoring rules, b empirical cross entropy (ECE) plot (description in the text)

responses considered under H_1 and H_2 hypotheses. Taking into account Eq. 6, it could be expressed as:

$$LS = \frac{1}{N_1} \sum_{i=1}^{N_1} \log_2 \left[1 + \frac{\Pr(H_2)}{LR_i \Pr(H_1)} \right] + \frac{1}{N_2} \sum_{j=1}^{N_2} \log_2 \left[1 + \frac{LR_j \Pr(H_1)}{\Pr(H_2)} \right], \quad (7)$$

where N_1 and N_2 refer to the number of experiments performed in the aim to estimate the rates of false negative and false positive answers (under H_1 and H_2 hypotheses). The ECE as a proper measure of performance is then proposed as a modification of LS weighted by the relevant prior probabilities $\Pr(H_1)$ and $\Pr(H_2)$, and is expressed as follows:

$$ECE = \frac{\Pr(H_1)}{N_1} \sum_{i=1}^{N_1} \log_2 \left[1 + \frac{\Pr(H_2)}{LR_i \Pr(H_1)} \right] + \frac{\Pr(H_2)}{N_2} \sum_{j=1}^{N_2} \log_2 \left[1 + \frac{LR_j \Pr(H_1)}{\Pr(H_2)} \right]. \quad (8)$$

Assigning the exact values to the a priori probabilities $\Pr(H_1)$ and $\Pr(H_2)$ is not a forensic expert domain. To overcome the lack of this information when computing the ECE, the adopted solution is to plot ECE for a set of all possible prior probability quotients $\Pr(H_1)/\Pr(H_2)$, commonly referred to as *prior odds* in favour of H_1 : $\log_{10} Odds(H_1)$. The results of computing ECE are usually presented in the graphical form of diagrams consisting of three curves (Fig. 1b):

- (a) The solid (red) curve (named *experimental*) represents the ECE values calculated using the particular

proposed LR model, which performance is under consideration (8)

- (b) The dashed (blue) curve (named *calibrated*) represents the ECE values obtained for the experimental LR values transformed with Pool Adjacent Violators algorithm (PAV) [6, 7, 29]. The discriminating power of the calibrated method remains unchanged, which means that such LR values set has the best performance of all other LR sets (i.e. LR values strongly support the correct hypotheses and give weak support for the incorrect) offering the same discriminating power expressed by the levels of false positive and false negative answers. Therefore, the observed differences between the *calibrated* curve and the ECE curve for the experimental LR set are due to the problems with the calibration of the applied evidence evaluation method,
- (c) The dotted (black) curve (named *null*) represents the performance of a model, which does not support any of the hypotheses ($LR = 1$). This model always produces identical curves, which are reference curves for estimating the model performance.

The relative location of the ECE curve for the experimental set of LR values (solid, red line) to the remaining two (dashed, blue and dotted, black lines) illustrates the performance of the method of evidence evaluation. If there is still too much uncertainty within the model about the correct hypothesis, the ECE curve for experimental LR values will grow, and more information will be needed in order to know the true hypothesis. The best models for the interpretation of the evidence under analysis are these for which the ECE curve lies as low as possible and as close as possible to the *calibrated* curve. If the curve appears to have greater

values than the ones in the *null* method, the evidence evaluation introduces more misleading information than when assuming evidence neutrality ($LR = 1$). For the purposes of this research, the information about the reduction of information loss due to the analysis of evidence always refers to the point of $\log_{10} Odds(H_1) = 0$, although it could also be compared for any value of the prior odds.

Wavelet transform

Wavelet transform enables for projecting the signal (e.g. spectrum) onto the new basis of functions called *wavelets*. They are derived from one function called *mother wavelet* Ψ by its dilation or contraction in the frequency domain (controlled by scaling parameter a) and shifting in the time domain (determined by localisation parameter b) in order to cover the whole spectrum frequency and time information:

$$\Psi(x) = a^{-1/2} \Psi\left(\frac{x-b}{a}\right), \quad a, b \in \mathbb{R}, \quad a \neq 0. \quad (9)$$

There are many mother wavelets available such as the most popular Daubechies [11], Coiflet or Symmlet. Wavelets take advantage that unlike the Fourier transform which is only frequency-localised, they provide time-frequency analysis, as they can represent the signal with good time and frequency resolution. The continuous wavelet transform (CWT) of the signal f can be seen as its convolution with the wavelets of different scales and localisations and is given by:

$$W(a, b) = \int_{-\infty}^{\infty} \Psi(x) f(x) dx. \quad (10)$$

The transform coefficients can be seen as the measure of the similarity between the wavelets and the analysed signal.

Such signal representation delivers many redundant information. Therefore, sampling of the time and frequency space is the idea behind the discrete wavelet transform (DWT) with scaling and localisation parameters restricted to $a = 2^j$ and $b = 2^j k$ with j being the resolution or decomposition level.

Each signal $f(x)$ can be approximated using the sum of basis functions $\varphi_{j,i}(x)$:

$$f(x) \simeq \sum_i V_i^j \varphi(2^{-j}x - i), \quad (11)$$

In Eq. 11, V_i^j are the scale coefficients at level j and i is a localisation parameter. The scale is the highest, when the frequency is the lowest.

The signal $f(x)$ can also be represented at the next level of approximation $j + 1$ with less detailed approximation. Then:

$$f(x) \simeq \sum_i V_i^{j+1} \varphi(2^{-(j+1)}x - i). \quad (12)$$

The amount of information that was lost due to proceeding to the next level of approximation from j to $j + 1$ is completed with the linear combination of wavelet functions derived by dilation or contraction and shifting of the *mother wavelet*. The wavelet coefficients W_i^{j+1} of the combination provide the information about the details lost in the approximation of the signal:

$$\begin{aligned} f(x) &\simeq \sum_i V_i^j \varphi(2^{-j}x - i) \\ &= \sum_i V_i^{j+1} \varphi(2^{-(j+1)}x - i) \\ &\quad + \sum_i W_i^{j+1} \psi(2^{-(j+1)}x - i). \end{aligned} \quad (13)$$

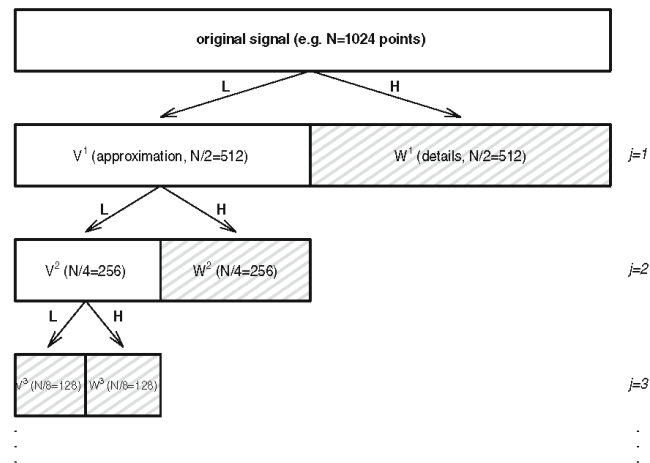
In fact, discrete wavelet transform may be considered as a sequence of high- and low-pass filters of the analysed signal. The wavelet function $\Psi_{j,i}(x)$ can be seen as a high-pass filter, whereas the low-pass filter is defined by scaling function $\varphi_{j,i}(x)$. The common algorithm for computing the discrete wavelet coefficients is the *Mallat pyramid algorithm* [16]. At each discrete scale j (level of resolution), the signal is infinitely extended at both ends and recursively passed through the pair of low- (L) and high-pass filters (H):

$$\begin{aligned} V^j &= \mathbf{L} V^{j-1} \\ W^j &= \mathbf{H} V^{j-1}. \end{aligned} \quad (14)$$

The output of the high-pass filter is a set of wavelet coefficients (W^j) and represents the high-frequency information contained in the signal. This is mainly the noise or some other redundant information, which have significantly higher frequency components than the relevant signal. Similarly, the low-pass filter extracts the low-frequency components of the signal in the form of scaling coefficients (V^j).

At each next level j , the details part is kept and only the outcome of the low-pass filter on the level $j - 1$ (generating the approximation part) is decomposed into two parts: the approximation of the signal V^j and its details W^j (Fig. 2). For example, when $j = 1$, the approximation of the signal is given by scale coefficients V^1 and the details are defined by W^1 coefficients (Fig. 2). Then the V^1 signal approximation coefficients are decomposed into its approximation part V^2 and details information W^2 . At each next level, the width of the wavelet is doubled and hence the scale is doubled. Consequently, the sampling frequency and hence resolution are two times lower, so the number of the points in the signal may be halved in reference to the signal they are formed from at the previous level $j - 1$. This process is known as *downsampling*. Each subsequent approximation is the more smoothed version of the original signal, keeping its shape using less data (more compressed dataset deprived of details). The effect of smoothing the signal is achieved by removing the details part from the spectrum. The process of decomposition continues until there is only one value left or the desired level of approximation is reached.

Fig. 2 An idea of Mallat's algorithm for signal decomposition to the $j = 3$ rd level of decomposition using discrete wavelet transform (DWT). V corresponds to approximation coefficients, whereas W relates to the details coefficients from the wavelet transform. The numbers in the superscript indicate the level of decomposition



The signal from the j -th level can be represented by the sum of approximation and details representations using basis functions at the next level $j + 1$, which is the idea of multiresolution analysis:

$$\begin{aligned} V^j &= V^{j+1} + W^{j+1} = V^{j+2} + W^{j+2} + W^{j+1} \\ &= \dots = V^{j+x} + W^{j+x} + W^{j+x-1} \\ &\quad + \dots + W^{j+1}. \end{aligned} \quad (15)$$

Therefore, due to ability of wavelets to reveal various signal characteristics on different levels, they are often referred to as a signal microscope.

The original signal can be reconstructed using inverse discrete wavelet transform, which operates on the collection of the scale coefficients (approximation part) at the last level and all the wavelet coefficients (details information) from the first to the last level of the decomposition: $V^j, W^1, \dots, W^{j-1}, W^j$ using the conjugated pair of filters H^* and L^* :

$$\begin{aligned} V^{j-1} &= L^* V^j \\ V^{j-1} &= H^* W^j. \end{aligned} \quad (16)$$

The details may also be investigated at different decomposition levels. Then the Mallat's pyramid is growing and such a type of decomposition is called the *wavelet packet transform* (WPT), being a generalisation of the DWT [23, 24]. The DWT is in fact only one path of the Mallat algorithm.

The aim of the DWT is to obtain sparse representation of the signal features, which is preserved in a few number of coefficients with high amplitudes. This is mostly used for data compression using DWT, which effectively reduces the required space for signals storage by

cutting-off the coefficients that will not be further archived. Similar wavelet properties stay behind the wavelets being useful in data denoising and smoothing, which are typical signal treatments to extract the relevant information from the analytical output. The details coefficients attributed to the high-frequency noise can be discarded by setting them to 0 without causing too much distortion to the original signal or losing too much information. However, it is crucial to choose the most suitable mother wavelet, which will transform the signal, so that the real signal is effectively isolated from the causal noise represented by very small coefficients, which can be filtered out using thresholding methods. In the aim to de-noise the signal, the following steps should be accomplished:

- (1) Application of the wavelet transform to the original signal
- (2) Truncating the wavelet coefficients using hard or soft thresholding policy.

Hard thresholding sets all the coefficients absolute values below a threshold value t to 0:

$$W_{hard}^j = \begin{cases} 0, & \text{if } |W^j| < t \\ W_j, & \text{if } |W^j| \geq t \end{cases}. \quad (17)$$

In soft thresholding, the coefficients absolute values below the threshold are set to 0 and the remaining are suppressed by this value:

$$W_{soft}^j = \begin{cases} 0, & \text{if } |W^j| < t \\ \text{sgn}(W^j)(|W^j| - t), & \text{if } |W^j| \geq t \end{cases}. \quad (18)$$

- (3) If necessary, performing the inverse discrete wavelet transform to obtain the smoothed version of the original signal.

One of the widely applied threshold propositions [5] is the universal threshold computed as follows:

$$t = \hat{\sigma} \sqrt{2 \log N}, \quad (19)$$

where $\hat{\sigma}$ is the measure of the wavelet coefficients dispersion expressed by their standard deviation or in more robust way by median absolute deviation MAD ($\hat{\sigma} = 1.4826 \cdot MAD(W)$).

The baseline drift is also a factor that may occur problematic in spectra interpretation, especially in quantitative aspects. The continuous wavelet transform (CWT) was proposed as a useful tool separating the peaks from the fluctuating background [15]. Each signal can be represented as a sum of the low-frequency part corresponding to background and peak information with higher frequency than that of background. Since the CWT is a convolution of the signal and the appropriate wavelet, the low-frequency part can be successfully suppressed after the transform while the peaks information remains unchanged.

Results and discussion

Experimental protocol and descriptive statistics

There were three databases for which the performance of the constructed LR models was investigated:

1. Database of FTIR spectra recorded for 27 polypropylene (containing some additional compounds, e.g. polyethylene) samples from car body parts and plastic containers
2. Database of Raman spectra recorded for 30 blue solid automotive paints
3. Database of Raman spectra recorded for 30 blue metallic automotive paints

All the calculations concerning the spectra pretreatment, wavelet transform and LR calculations were performed using R software [18]. The relevant R routines are available by contacting the corresponding author.

Signal pretreatment

FTIR spectra In the literature, it is advised to apply the multiplicative scatter correction (MSC) and probabilistic quotient normalisation (PQN) for FTIR spectra pretreatment. However, both methods are dependent on the whole database of the collected spectra. Therefore, other technique for data preprocessing was applied, which treats each spectrum independently, namely standard normal variate (SNV) for light scatter correction. The normalisation of the spectra reduced the baseline drift and the differences in signal

intensity due to varying thicknesses of samples. Illustration of the effect of the polypropylene spectra pretreatment using SNV is presented in Fig. 3b. For further purposes (see “Data dimensionality reduction procedure”) the signal of length 2048 points, being power of 2 (2^{11}), was generated by reflection inverse method of the original signal containing 1764 points.

Raman solid and metallic car paints spectra Since Raman spectra (e.g. Fig. 3d) recorded on different days differed amongst themselves in wavenumbers, for which intensity was measured and due to unequally spaced data (signal was measured for wavenumbers with a changing step within a single spectrum), it became impossible to describe all the samples by signal intensities measured for a unique set of wavenumbers (acting as variables). Due to the mentioned reasons, each spectrum was limited to the range 200–2300 cm^{-1} containing chemical information (original spectra were recorded up to 2500 cm^{-1}) and reconstructed due to unequally spaced signal measurements using two interpolation methods in order to obtain the missing information. To produce equally spaced data, a set of 1024 new variables (wavenumbers) within the range 200–2300 cm^{-1} (i.e. sampled every ca. 2.053 cm^{-1}) was created so that they covered the whole range of Raman spectrum containing entire relevant chemical information. The reason for taking the number of variables as the power of 2 lies in the requirements for wavelet transform dealing only with signals with the number of data points being power of 2. The first method of spectra reconstruction was a linear interpolation, in which intensity as each wavenumber (variable) of the new set of 1024 variables was estimated from the linear equation ($y=ax+b$) joining two nearest measured signal intensities. The second method involved spline interpolation [14] in which cubic polynomials were used for fitting the spectrum and reconstructing its intensity values for a set of 1024 established wavenumbers. It should be emphasised that the spline interpolation is a method of smoothing the signal and in general should not be used prior to wavelet transform (which smooths the signal as well). However, due to the structure of the recorded spectra, it was necessary to apply it for their reconstruction to complete the missing information with equally spaced data prior to using WT as a data dimensionality reduction technique.

For dealing with the fluorescence effect which lifts up the baseline, another type of wavelet transform, namely continuous wavelet transform (CWT, “Wavelet transform”) was applied for the analysed spectra, which enabled for preserving the true signal information by separating the peaks from the low-frequency baseline (mainly attributed to the fluorescence effect) [25]. The baseline drift of each individual spectrum was removed using the Mexican hat wavelet [11] with the same set of CWT parameters for each spectrum

3366

Agnieszka Martyna, et al.

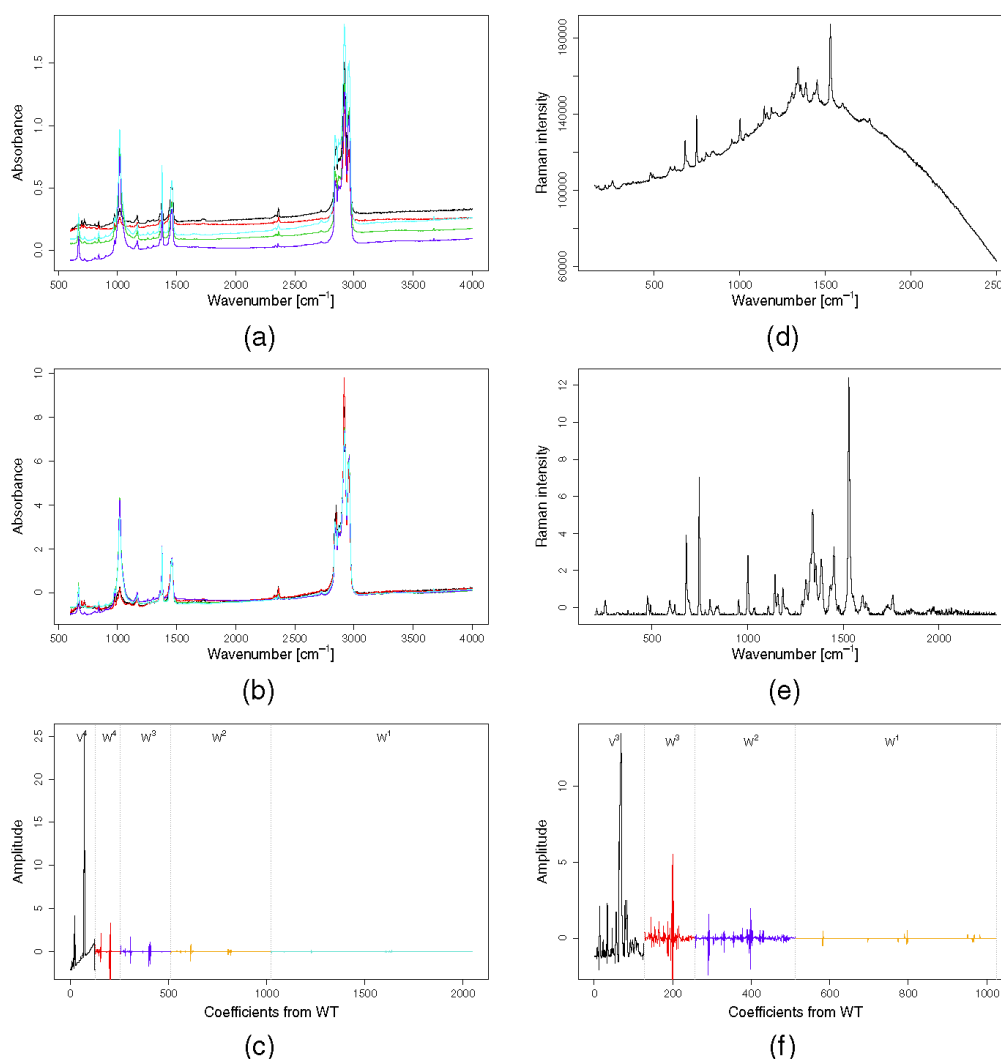


Fig. 3 FTIR spectra for five samples of plastics with polypropylene as a main compound: **a** original, **b** after SNV correction, **c** after WT and Raman spectrum for metallic blue car paint: **d** original, **e** after spline reconstruction, baseline correction and SNV normalisation, **f** after WT

(Fig. 3e). Finally, the spectra were normalised using standard normal variate (SNV).

Data dimensionality reduction procedure

Dealing with as many variables as in spectra (signal intensities measured by more than 1000 wavenumbers)

is problematic from the perspective of statistical computing methods such as likelihood ratio approach. When the number of the variables exceeds the number of the samples they describe, it becomes impossible to reliably estimate the LR models parameters, such as means, variances or covariances. The solution to this problem may be an application of the discrete wavelet transform supported

by other variables selection techniques. As mentioned in “Wavelet transform”, in the wavelet transform at each subsequent level of decomposition, the number of approximation coefficients is halved, which provides more smoothed version of the original signal, however, still preserving its shape and the relevant spectra features. The information which is lost at each subsequent decomposition level is completed by details coefficients. Even though considering only the approximation part of the transform may seem to be sufficient as it preserves most of spectra features and effectively reduces the dimensionality, some relevant information may also be hidden in details coefficients, especially these with high amplitudes. In the proposed research, DWT using the least asymmetric Daubechies wavelet number 5 as a mother wavelet was used for spectra compression [11]. The details coefficients at the first decomposition level W^1 with absolute values below the established threshold were set to 0 according to the hard thresholding technique (17), which enhanced the relevance of the coefficients with high amplitudes. The threshold was estimated using the universal policy (19) with wavelet coefficients dispersion estimated by median absolute deviation (MAD) of the coefficients derived from details W^1 at the $j = 1$ decomposition level.

After the transform the original FTIR spectra were represented by approximation coefficients at the fourth level of decomposition (V^4) and details coefficients W^4 , W^3 , W^2 and W^1 at the $j = 4, 3, 2, 1$ decomposition levels (Fig. 3c). There were, respectively, 128, 128, 256, 512 and 1024 of such coefficients describing each spectrum. The Raman spectra were decomposed to the third level of decomposition with 128 approximation coefficients ($j = 3$) and details coefficients at the $j = 3$ (128 coefficients), $j = 2$ (256 coefficients), and $j = 1$ (512 coefficients) decomposition levels (Fig. 3f). The reason for continuing the DWT up to the fourth and third levels as the final ones was that they were the last with sufficient resolution of approximation part to distinguish between the peaks being relevant from the chemical perspective. The next levels of approximation

parts caused too much distortion compared to the original signal by merging close peaks.

Even though most of the details coefficients at the first level of decomposition (W^1) were truncated to 0, additional supportive criterium for reducing data dimensionality was applied. The coefficients within each of the three databases were sorted according to the part of variance they explained and for further analysis only these which accounted for cumulative variance greater than 99 % of total variance were considered. These sets representing the best basis of the coefficients within each of the considered three databases were established from 1000 randomly created subsets of spectra databases. The number of the remaining coefficients is presented in Table 1.

Further data dimensionality reduction results from the LR models requirements for which it is crucial that the within-object variability (U ; 2) is much lower than the between-object variability (C ; 3). This ensures that data for individual samples are far more similar than the data describing different samples. Meeting such conditions may lead to reduction in the number of the false LR model responses. The constraints for the relation between C and U (i.e. $U \ll C$) were used as a criterion for choosing the variables, which are the most suitable for solving the comparison problem. For Raman spectra, the ratio value of $C/U = 100$ was initially set as a threshold. Since FTIR spectra were observed as much more similar to each other (only polypropylene spectra were investigated), the threshold was less demanding and required only that $C > U$.

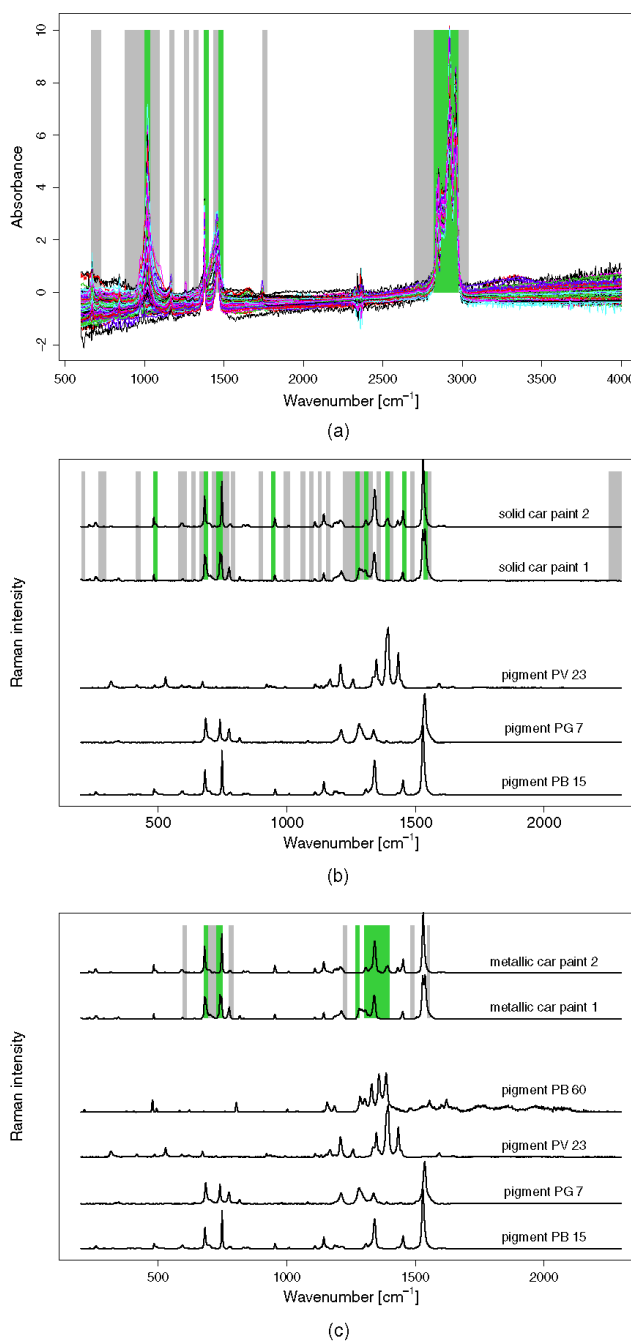
Most of the selected variables derived from DWT and subjected to further variables selection techniques were corresponding with parts of FTIR and Raman spectra carrying some chemical information. For FTIR spectra, the focus was concentrated on the absorbance bands typical mainly for polypropylene (or polyethylene, which is a compound frequently encountered with polypropylene). For Raman spectra, the peaks associated with pigments present in car paint samples were investigated, i.e. copper

Table 1 The number of variables that remained after each data dimensionality reduction technique

Database	Reconstruction technique	No. of variables		
		Original spectrum	With $U \ll C$	Used for LR models
FTIR spectra	Not applicable	2048	57	18
Raman spectra for solid car paints	Linear	1024	46	14
Raman spectra for solid car paints	Spline	1024	45	14
Raman spectra for metallic car paints	Linear	1024	16	10
Raman spectra for metallic car paints	Spline	1024	19	10

U and C are the univariate equivalents of within- and between-object variance-covariance matrices

Fig. 4 The illustration of the wavenumbers ranges taken into account by the selected variables for **a** FTIR spectra, **b** solid car paints Raman spectra and **c** metallic car paints Raman spectra. Light shading (*gray*) corresponds to these chosen based on the sequence of dimensionality reduction techniques (DWT and relevant C/U threshold) and dark shading (*green*) relates to the finally selected variables for LR calculations corresponding with chemical information



Evidential value of FTIR and Raman spectra of polymers and paints

3369

Table 2 The ranges of wavenumbers, types of bonds vibrations (for FTIR spectra) and pigments (in the case of Raman spectra) producing signal by the wavenumbers associated with the selected variables

Variable name	Wavenumbers [cm ⁻¹]	Chemical information
FTIR spectra		
V4_73	2823–2853	Stretching vibration CH_2
V4_74	2854–2882	Asymmetrical vibration CH_2
W4_14	1003–1032	Absorption associated with other constituents
W4_26	1373–1402	Deformation vibration symmetrical
W4_29	1465–1494	Deformation vibration asymmetrical
W4_73	2823–2853	Stretching vibration CH_2
W4_74	2854–2883	Asymmetrical vibration CH_2
W4_75	2884–2914	Stretching vibration CH_2
W4_76	2915–2945	Asymmetrical vibration CH_2
W4_77	2946–2975	Asymmetrical vibration CH_2
W3_27	1003–1017	Absorption associated with other constituents
W3_28	1018–1032	Absorption associated with other constituents
W3_51	1373–1386	Deformation vibration symmetrical
W3_146	2838–2853	Stretching vibration CH_2
W3_147	2854–2868	Asymmetrical vibration CH_2
W3_148	2869–2883	Stretching vibration CH_2
W3_151	2915–2929	Asymmetrical vibration CH_2
W3_153	2946–2960	Asymmetrical vibration CH_2
Raman spectra of solid car paints		
V3_30	678–692	Pigments PB 15, PG 7
V3_33	727–741	Pigments PG 7
V3_46	940–955	Pigment PB 15
V3_66	1269–1283	Pigment PG 7
V3_68 (only for spline rec.)	1301–1316	Pigment PB 15
V3_73	1383–1398	Pigment PV 23
V3_77	1449–1463	Pigment PB 15
W3_18	481–495	Pigments PB 15, PV 23
W3_30	678–692	Pigment PB 15
W3_33	727–741	Pigment PG 7
W3_66	1269–1283	Pigment PG 7
W3_77	1449–1463	Pigment PB 15
W3_82	1531–1545	Pigments PB 15, PG 7
W2_67	743–750	Pigments PB 15, PG 7
Raman spectra of metallic car paints		
V3_30	678–692	Pigments PB 15, PG 7
V3_66 (only for spline rec.)	1268–1283	Pigments PB 60, PV 23
V3_68	1301–1317	Pigment PB 60
V3_69	1318–1333	Pigment PB 60
V3_70	1334–1348	Pigment PB 15
W3_33	727–741	Pigment PG 7
W3_71	1350–1366	Pigment PB 60

Table 2 (continued)

Variable name	Wavenumbers [cm ⁻¹]	Chemical information
FTIR spectra		
W3_72	1367–1382	Pigments PB 60, PV 23
W3_73	1383–1398	Pigment PV 23
W2_67	743–750	Pigment PB 15

Variables starting with V correspond to approximation coefficients, whereas these starting with W relate to the details coefficients from the wavelet transform. The numbers staying beside indicate the level of decomposition. Note that variables W3_66 and V3_66 for Raman solid and metallic car paint samples, respectively, cover the same ranges of wavenumbers, but depending on the car paint type, they refer to different pigments

phthalocyanine—PB 15, dioxazine violet—PV 23, chlorinated copper phthalocyanine—PG 7 and indanthrone—PB 60 (occurring only in metallic car paint samples). A few of the variables which were related with non-informative bands or peaks (e.g. unexplained drift of the baseline) were neglected. All selected variables are illustrated with light gray shaded areas in Fig. 4, while darker (green) areas correspond with the variables finally chosen as chemically-related. Finally, there were 18 variables considered for FTIR spectra, 14 for Raman solid car paints spectra and 10 for metallic car paints spectra. Their description along with the wavenumbers they are associated with, bonds vibrations responsible for the absorbance in the case of FTIR spectra and Raman scattering intensity related to particular pigments in the case of Raman spectra they represent, is given in Table 2.

Figure 5 illustrates the descriptive statistics in the form of boxplots combined with probability density functions (known as *violin plots*) and correlation coefficients arrays. Due to multimodal distributions of most of the variables, the kernel density estimation was used for modelling the between-object probability density function [29].

Likelihood ratio models

Firstly, for the selected variables, the univariate LR models were proposed using kernel density estimation (KDE) for modelling the between-object distribution. Their performance was evaluated by controlling the levels of false positive and false negative answers and using the empirical cross entropy approach. The levels of false positive and false negative rates were estimated by conducting the experiments described in “Assessing the LR models performance—empirical cross entropy”. There were $N_2 = \binom{27}{2} = \frac{27!}{2!(27-2)!} = \frac{27 \cdot (27-1)}{2} = 351$ experiments under H_2 for estimation of false positives and $N_1 = 27$ experiments under H_1 for false negatives estimation (Table 3) in the case of FTIR spectra. For solid and metallic car paints Raman spectra databases, there were respectively, $N_2 = \binom{30}{2} = \frac{30!}{2!(30-2)!} = \frac{30 \cdot (30-1)}{2} = 435$ experiments under

H_2 for estimation of false positives and $N_1 = 30$ experiments under H_1 for false negatives estimation (Table 4). The better the performance of the LR model is, the lower the rates of false positive and false negative answers it delivers. For taking into account not only the information about falsely supported hypotheses, but also how strong this support is, empirical cross entropy was applied for assessing the performance of the LR models (Tables 3 and 4).

Apart from simple univariate LR models, multivariate considerations were also addressed (Tables 3 and 4). They were constructed following some general rules.

1. Variables corresponding to different Raman bands (various pigments) or FTIR absorption bands were combined into the multivariate LR models, so that they embrace as much varied information as possible.
2. If possible, each clique in the multivariate LR models represented information about different pigments in Raman spectra or absorption bands in FTIR spectra.
3. Highly correlated variables formed cliques for LR computation, while these low correlated with the others were treated separately as a multiplication factor in the multivariate LR models (so-called *naïve* approach).
4. Only the variables delivering low levels of false positive and false negative LR models responses were considered in multivariate LR models.

Results for FTIR spectra database of polypropylene samples The lowest rate of false positives was delivered by the W4_73, W3_146, W3_147 variables (up to 13.7 % of false positive and no false negative answers; Table 3). These results are confirmed by ECE plots, in which the solid lines corresponding with the experimental LR values indicate significant reduction of information loss due to evidence analysis using the LR models under investigation. The values for $C_{lr,cal}$ and $C_{lr,exp}$ from BCE plots analysis are presented in Table 3.

In order to incorporate as much information as possible from the FTIR spectra, the multivariate LR models were constructed. Since there is strong correlation (Fig. 5b) between all of the considered variables, which performance

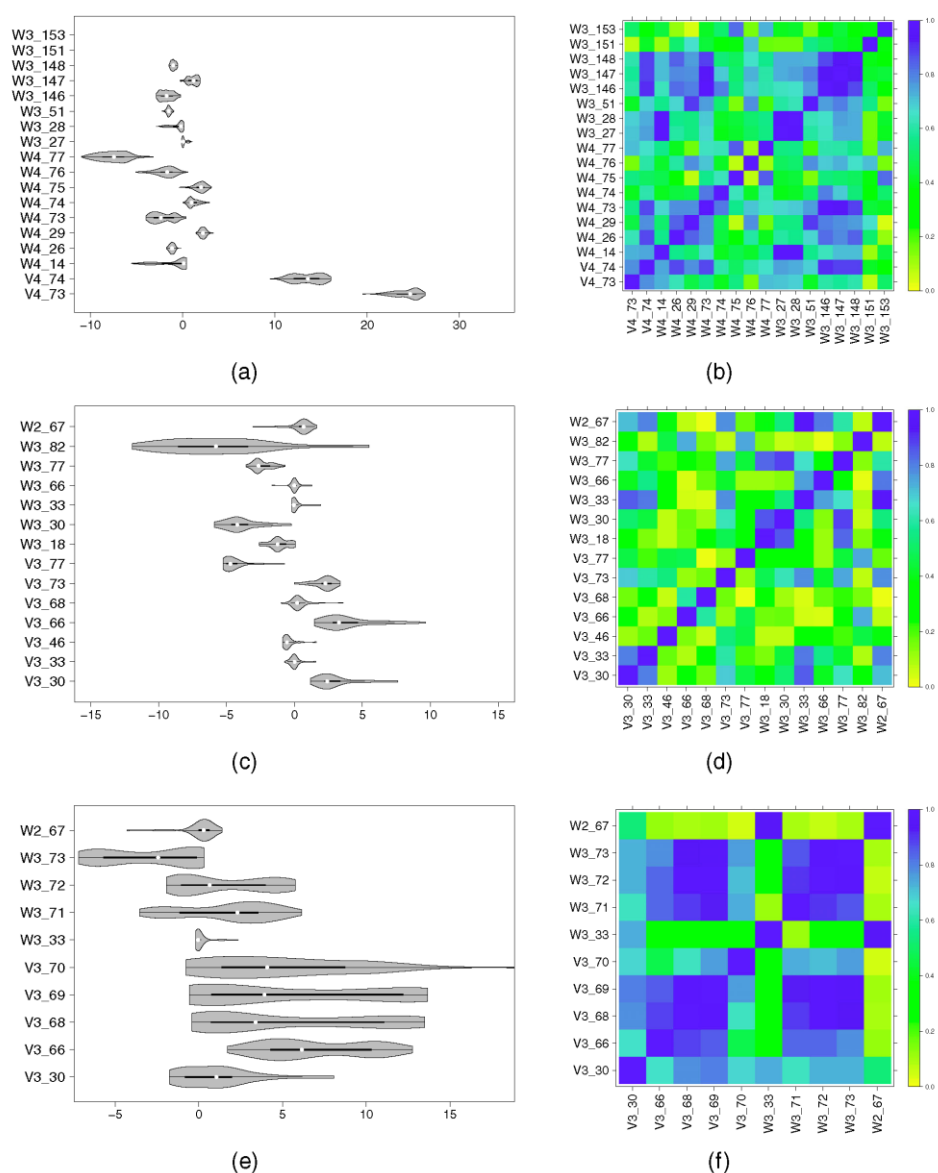


Fig. 5 Boxplots combined with probability density curves (known as *violin plots*) and correlation arrays for the selected variables for **a**, **b** polypropylene samples, **c**, **d** solid car paints (spline reconstruction) and **e**, **f** metallic car paints (spline reconstruction). Variables starting with V correspond to approximation coefficients, whereas these starting with

W relate to the details coefficients from the wavelet transform. The *numbers* staying beside indicate the level of decomposition. In the violin plots, the *gray area* illustrates the probability density function and the *lines* in the middle simulate boxplots with median as a white dot

Table 3 False positive, false negative rates and the empirical cross entropy values ($C_{lr,cal}$ for calibrated curve and $C_{lr,exp}$ for experimental curve) for prior $\log_{10}(Odds(H_1)) = 0$ of univariate and multivariate LR models proposed for the selected variables for FTIR spectra database

LR models based on variables	False positive [%]	False negative [%]	$C_{lr,exp}$ [%]	$C_{lr,cal}$ [%]
Univariate LR models				
V4_73	29.3	3.7	54.2	47.7
V4_74	19.9	0.0	41.3	34.7
W4_14	30.2	3.7	60.3	46.4
W4_26	25.9	0.0	52.3	43.1
W4_29	27.1	7.4	58.4	51.3
W4_73	12.3	0.0	29.1	24.8
W4_74	16.5	0.0	36.2	30.1
W4_75	25.9	7.4	61.1	52.8
W4_76	26.5	3.7	57.5	50.3
W4_77	29.9	0.0	54.0	45.4
W3_27	31.6	3.7	57.3	46.0
W3_28	35.0	3.7	62.2	49.3
W3_51	25.9	11.1	60.2	53.5
W3_146	12.5	0.0	28.3	22.7
W3_147	13.7	0.0	29.6	24.0
W3_148	18.8	0.0	38.7	33.1
W3_151	39.6	7.4	74.0	64.9
W3_153	35.0	0.0	64.6	53.3
Multivariate LR models				
(W4_26, W4_29, V4_74, W4_73, W4_74)	2.3	0.0	4.9	2.4
(W4_26, W4_29, W3_146, W3_147, W3_148)	5.1	0.0	14.0	9.8

Variables starting with V correspond to approximation coefficients, whereas these starting with W relate to the details coefficients from the wavelet transform. The numbers staying beside indicate the level of decomposition

of univariate LR models was satisfactory, both proposed multivariate LR models accounted for this correlation. Both of them took into account the variables W4_26 and W4_29 corresponding to the two absorption bands typical for polypropylene samples in the range 1373–1402 and 1465–1494 cm^{-1} . The remaining variables were related to the absorption bands in the range 2823–2883 cm^{-1} (model $LR_{p1} = LR(W4_26, W4_29, V4_74, W4_73, W4_74)$) and 2838–2883 cm^{-1} (model $LR_{p2} = LR(W4_26, W4_29, W3_146, W3_147, W3_148)$). Model LR_{p1} seems to outperform the LR_{p2} concerning the levels of false positive and false negative answers, as well as much more significant reduction of information loss, reaching 95.1 % for LR_{p1} and 86.0 % for LR_{p2} (Fig. 6a, b).

Results for Raman spectra database of solid car paints
The univariate LR models (Table 4) deliver for most of the variables satisfying levels of false positive and false negative answers. False positives are usually not more than 20 %, even though for one variable, namely W3_66, they reach 48.3 %. For all models, the levels of false negative

answers are much lower and do not exceed 10 %. Empirical cross entropy parameters ($C_{lr,exp}$ and $C_{lr,cal}$; Table 4) indicate that W3_66, V3_68, V3_46 and V3_66 are the variables which introduce the greatest uncertainty in the model with their experimental ECE curves extending the null one depending on the method of spectra reconstruction. ECE method seems not to be robust enough for small databases, which means it becomes strongly affected by even single LR value strongly supporting the incorrect hypothesis. This seems to be the case for the abovementioned variables (e.g. V3_46 with low levels of false positive and false negative model responses, but poor performance according to ECE plot when spectra are reconstructed using linear interpolation), which performance in LR models improves when a few values yielding strongly misleading evidence are substituted by 1. Generally, the best performance can be assigned to variable W3_82, both according to the low levels of false model responses as well as ECE plots.

The compulsion for accounting for more than single variables relating to one (or two) pigments Raman bands leads to proposition of the multivariate LR models. For solid car

Evidential value of FTIR and Raman spectra of polymers and paints

3373

Table 4 False positive (FP), false negative (FN) rates and the empirical cross entropy values ($C_{llr,cal}$ for calibrated curve and $C_{llr,exp}$ for experimental curve) for prior $\log_{10}(Odds(H_1)) = 0$ of univariate and multivariate LR models proposed for the selected variables for solid and metallic car paints Raman spectra database (after linear and spline reconstructions)

LR models based on variables	FP [%]	FN [%]	FP [%]	FN [%]	$C_{llr,exp}$ [%]	$C_{llr,cal}$ [%]	$C_{llr,exp}$ [%]	$C_{llr,cal}$ [%]
	Linear		Spline		Linear		Spline	
Raman spectra of solid car paints								
Univariate LR models								
V3_30	17.7	3.3	17.9	3.3	40.2	31.6	42.0	32.5
V3_33	15.6	3.3	16.3	0.0	33.6	29.1	34.3	29.9
V3_46	21.8	3.3	20.9	3.3	150.2	38.4	65.5	35.9
V3_66	15.9	3.3	14.9	3.3	76.3	28.4	134.2	29.2
V3_68	31.5	3.3	20.9	6.7	140.7	51.1	47.9	40.0
V3_73	9.9	6.7	9.7	6.7	34.0	25.6	34.6	25.9
V3_77	17.0	0.0	16.8	0.0	33.9	28.2	35.0	30.0
W3_18	12.0	6.7	10.1	3.3	36.9	28.7	35.7	23.9
W3_30	13.8	3.3	12.9	3.3	48.3	30.3	50.8	27.0
W3_33	31.0	3.3	31.0	3.3	72.8	52.0	65.9	51.9
W3_66	48.3	3.3	48.3	3.3	178.7	66.4	181.9	67.5
W3_77	12.6	3.3	11.5	3.3	36.3	24.6	35.2	23.6
W3_82	9.4	3.3	9.2	3.3	30.6	22.8	29.8	22.5
W2_67	16.3	3.3	16.1	0.0	33.5	28.7	32.6	27.8
Multivariate LR models								
(V3_33,V3_73,W2_67),(V3_77)	0.7	0.0	0.7	3.3	4.3	1.7	9.0	2.0
(V3_30),(W3_18),(W3_82)	0.7	0.0	0.7	3.3	5.7	2.4	11.8	2.1
Raman spectra of metallic car paints								
Univariate LR models								
V3_30	10.8	3.3	10.6	3.3	89.3	25.2	87.4	23.4
V3_66	12.9	3.3	12.9	3.3	115.5	32.9	123.2	32.7
V3_68	9.7	6.7	9.4	6.7	42.8	25.5	36.3	24.6
V3_69	13.1	6.7	13.1	6.7	36.7	28.8	38.0	29.0
V3_70	12.0	3.3	11.7	3.3	125.3	25.0	134.8	26.0
W3_33	42.3	6.7	43.7	6.7	94.9	62.7	95.3	64.4
W3_71	10.1	3.3	10.1	3.3	28.6	23.7	26.2	22.8
W3_72	14.0	3.3	13.8	3.3	54.1	32.8	48.8	32.6
W3_73	15.6	3.3	15.9	3.3	81.7	35.2	69.1	35.3
W2_67	15.4	6.7	16.8	3.3	47.9	34.8	52.2	34.8
Multivariate LR models								
(W2_67),(V3_69,W3_71)	2.3	3.3	2.1	3.3	22.7	8.0	23.5	8.1
(W3_71,W3_72,W3_73),(W2_67),(V3_30)	1.6	6.7	1.6	6.7	129.2	9.4	112.0	8.9

Variables starting with V correspond to approximation coefficients, whereas these starting with W relate to the details coefficients from the wavelet transform. The numbers staying beside indicate the level of decomposition

paints, there are two of them. The first one concerns isolated Raman bands for all pigments present in the samples (PG 7, PB 15, PV 23) in the form of the following model: $LR_{s1} = LR(V3_33, V3_73, W2_67) \cdot LR(V3_77)$. It takes

into consideration the relatively low correlation (Fig. 5d) between V3_77 (pigment PB 15) and the remaining variables. The clique (V3_33, V3_73, W2_67) emphasises the high correlation between the variables corresponding with

3374

Agnieszka Martyna, et al.

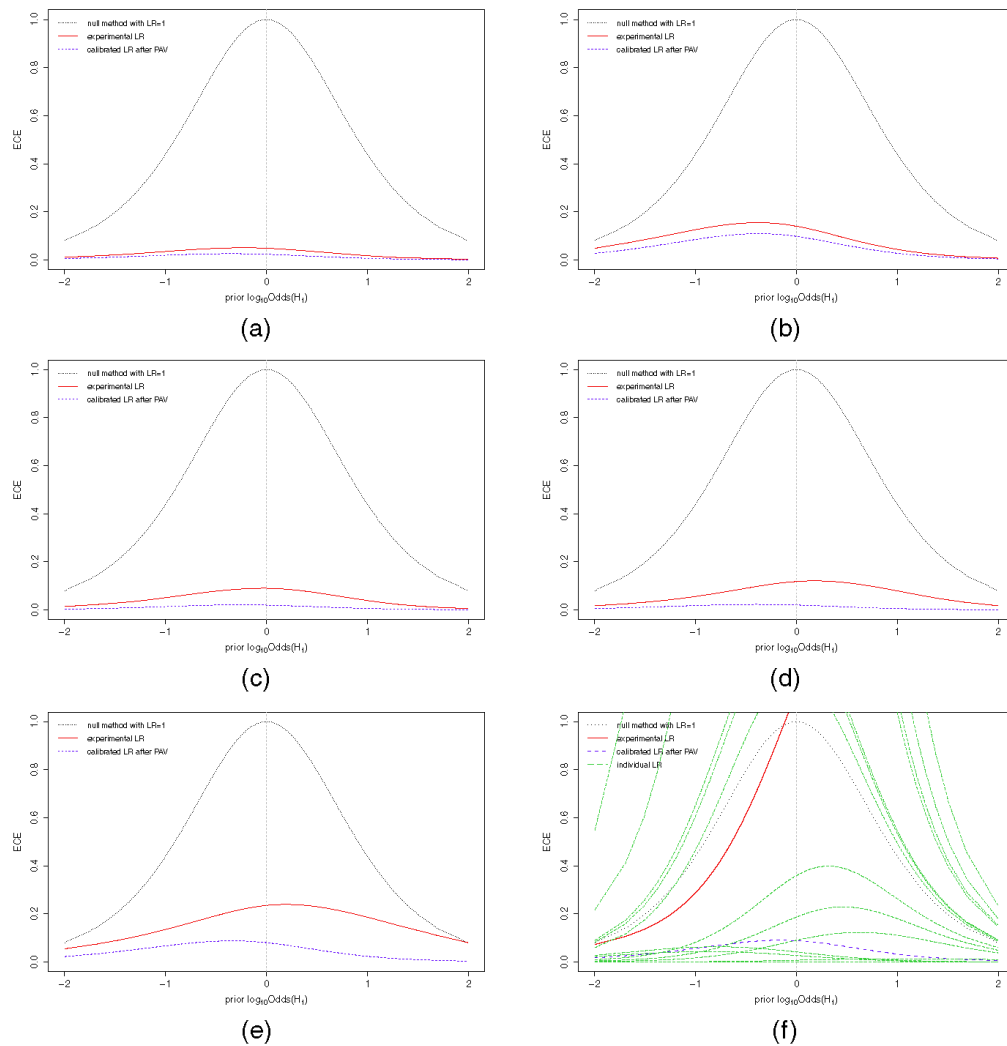


Fig. 6 Empirical cross entropy plots for **a** model $LR_{p1} = LR(W4.26, W4.29, V4.74, W4.73, W4.74)$ for polypropylene, **b** model $LR_{p2} = LR(W4.26, W4.29, W3.146, W3.147, W3.148)$ for polypropylene, **c** model $LR_{s1} = LR(V3.33, V3.73, W2.67) \cdot LR(V3.77)$ for solid car paints, **d** model $LR_{s2} = LR(V3.30) \cdot$

$LR(W3.18) \cdot LR(W3.82)$ for solid car paints, **e** model $LR_{m1} = LR(W2.67) \cdot LR(V3.69, W3.71)$ for metallic car paints and **f** model $LR_{m2} = LR(W3.71, W3.72, W3.73) \cdot LR(W2.67) \cdot LR(V3.30)$ for metallic car paints. The ECE plots in (e–f) refer to the LR models constructed for spectra reconstructed using spline method

pigments PG 7, PB 15 and PV 23. The second model computed as $LR_{s2} = LR(V3.30) \cdot LR(W3.18) \cdot LR(W3.82)$ is a *naïve* LR model taking advantage of low correlation (Fig. 5d) between the variables relating to wavenumbers by which different pigments (PG 7, PB 15 and PV 23) give Raman signal. These multivariate LR models proved to perform

very well with only 0.7 % false positive rate and up to 3.3 % false negatives. According to the significant reduction of information loss in ECE plots (Table 4), the models strongly support the correct hypothesis and do not tend to introduce misleading information. The ECE plots for multivariate LR models based on variables derived after spline

reconstruction of spectra are illustrated in Fig. 6c, d. Both multivariate LR models deliver lower rates of false positive and false negative answers as well as reduce the information loss more efficiently according to the ECE plots than univariate LR models.

The general performance of the proposed LR models is not affected by the method of spectra reconstruction (spline or linear interpolation) except for a few variables, namely V3_46, V3_66, V3_68. However, this is mainly caused by only single LR values strongly supporting the incorrect hypotheses.

Results for Raman spectra database of metallic car paints

The lowest rates of false LR model responses (Table 4) can be assigned to the V3_68 variable (both false positive and negative answers are lower than 10 %). Even though for most of the variables the rates of false positive and false negative answers were acceptable, there were also such variables which delivered too much of them (e.g. W3_33 with even 43.7 % of false positive answers). ECE approach (Table 4) pointed out that the reduction of information loss due to the model application is the highest for W3_71 variable. Even though not all of the proposed univariate LR models reduced the uncertainty according to ECE plots, they were taken into account for constructing the multivariate LR models as it was noticed that the reason for this situation is the strong support for the incorrect hypothesis related to only a single car paint. Replacing the strongly outlying LR values for within-object comparisons (aiming at estimation of the false negative answers) by 1 (neutral evidence) causes the ECE experimental LR curve decrease and reduce the information loss in a satisfying manner.

The first multivariate LR model accounted for a single variable W2_67 corresponding with PB 15 and highly correlated W3_71 and V3_69 (Fig. 5f) associated with PB 60 in the form of $LR_{m1} = LR(W2_67) \cdot LR(V3_69, W3_71)$. The second multivariate LR model combined the information from all of the pigments in the metallic car paints (PG 7, PB 15, PV 23 and PB 60) and was expressed as $LR_{m2} = LR(W3_71, W3_72, W3_73) \cdot LR(W2_67) \cdot LR(V3_30)$. Both LR models yielded satisfactory results concerning levels of false positive and false negative responses, which were not higher than 7 %. ECE plots indicate that the reduction of information loss is satisfying for model LR_{m1} (and is better than for univariate LR models), whereas LR_{m2} introduces a lot of misleading information. The reason for this are the few LR values strongly supporting the H_2 instead of H_1 or vice versa. Replacing these values by 1 makes the model performance acceptable. The ECE plots for multivariate LR models based on variables derived after spline reconstruction of spectra are illustrated in Fig. 6e, f. For getting an idea how individual LR values (computed for comparisons between particular two samples) affect the

overall measure of performance in the form of final ECE plot, an example is presented in Fig. 6f. It illustrates all the thin (green) curves which are the contributions to the final ECE solid (red) curve. The majority of them lies on the horizontal x-axis indicating that these LR values strongly support correct hypotheses. However, a few of them exceed the dotted (black) null curve as they represent the LR values giving misleading evidence (supporting the incorrect hypotheses). This is usually caused by some inhomogeneity of the samples. This plot proves that even few LR values supporting the wrong hypotheses may distort the whole LR model performance assessed using the ECE approach. Therefore, a lot of care should be taken when interpreting such results.

It was also observed that the general performance of the proposed LR models is not affected by the method of spectra reconstruction (spline or linear interpolation).

Conclusions

In this research, wavelet transform supported by the variance analysis was proposed for reducing the dimensionality of multivariate physicochemical data such as FTIR and Raman spectra with the aim of selecting the variables suitable for solving the comparison problem of polypropylene and blue car paint samples supported by the likelihood ratio approach. The results prove that the variables generated after the transform preserve various signal characteristics being sparse representation of the original signal by keeping its shape and relevant chemical information. The extracted variables sufficiently describe the analysed samples and carry information that is suitable for solving the comparison problem using appropriate LR models.

The computation experiments performed for estimating the levels of false positive and false negative models responses proved that most of the variables for which the LR models were constructed give strong support for the correct hypothesis and weak if the incorrect one is supported. This is also confirmed by the ECE plots, which prove that by using most of these variables the uncertainty about the correct hypothesis is significantly reduced. Moreover, the proposed LR models seem not to suffer due to bad calibration reasons. Nevertheless, the extension of the databases may improve the performance of the LR models.

Taking into account more chemically-related information from spectra in multivariate LR models strongly improves the results of LR models. This can be observed both in the lower levels of false positive and false negative answers and in significant reduction of information loss in most of the ECE plots for multivariate LR models. This is the area, which still attracts more attention and requires further investigation.

The studies presented in this paper constitute illustrative example of combining the chemometrics coping well with reduction of highly multivariate data with statistical models taking into account important factors for evidence evaluation.

Acknowledgements The authors are grateful for Prof. Beata Walczak (University of Silesia, Institute of Chemistry, Chemometric Research Group, Katowice, Poland) for her assistance and helpful comments in the field of wavelet transform.

The authors wish to thank Dr. Beata Trzcinska and Rafal Kowalski for their assistance in the FTIR analyses.

This research was funded by the National Science Centre in Poland within the project Preludium 6 no. 2013/11/N/ST4/01547 and the Institute of Forensic Research in Krakow within the project no. VI/K-2013/14.

References

- Aitken C, Lucy D (2004) Evaluation of trace evidence in the form of multivariate data. *Appl Stat* 53:109–122
- Aitken C, Taroni F (2004) Statistics and the evaluation of evidence for forensic scientists. Wiley, Chichester
- Aitken C, Zadora G, Lucy D (2007) A two-level model for evidence evaluation. *J Forensic Sci* 52:412–419
- Alsberg B, Woodward A, Kell D (1997a) An introduction to wavelet transforms for chemometricians: a time-frequency approach. *Chemom Intell Lab Syst* 37:215–239
- Alsberg B, Woodward A, Winson M, Rowland J, Kell D (1997b) Wavelet denosing of infrared spectra. *The Anal* 122: 645–652
- Ayer M, Brunk H, Ewing G, Reid W, Silverman E (1955) An empirical distribution function for sampling with incomplete information. *The Ann Math Stat* 26:641–647
- Best M, Chakravarti N (1990) Active set algorithms for isotonic regression; a unifying framework. *Math Prog* 47:425–439
- Brümmer N, du Preez J (2006) Application independent evaluation of speaker detection. *Comput Speech Lang* 20:230–275
- Caddy B (2002) Forensic Examination of Glass and Paint. Taylor and Francis
- Chau F, Liang Y, Gao J, Shao X (2004) Chemometrics: From Basics to Wavelet Transform. Wiley
- Daubechies I (1992) Ten Lectures on Wavelets. CBMS-NSF Regional Conference Series in Applied Mathematics, Philadelphia
- Geladi P (2003) Chemometrics in spectroscopy: Part 1. Classical chemometrics. *Spectrochim Acta B* 58:767–782
- Geladi P, Sethson B, Nystrom J, Lillhonga T, Lestander T, Burger J (2004) Chemometrics in spectroscopy: Part 2. Examples. *Spectrochim Acta B* 59:1347–1357
- Hazewinkel M, Subbotin Y (eds) (2001) Encyclopedia of Mathematics. Springer
- Ma C, Shao X (2004) Continuous wavelet transform applied to removing the fluctuating background in near-infrared spectra. *J Chem Inf Comput Sci* 44:907–911
- Mallat S (1989) A theory for multiresolution signal decomposition: the wavelet representation. *IEEE Trans Pattern Anal Mach Int* 7:674–693
- Martyna A, Sjaastad KE, Zadora G, Ramos D (2013) Analysis of lead isotopic ratios of glass objects with the aim of comparing them for forensic purposes. *Talanta* 105:158–166
- R Core Team, R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>
- Ramos D, Zadora G (2011) Information-theoretical feature selection using data obtained by scanning electron microscopy coupled with an energy dispersive X-ray spectrometer for the classification of glass traces. *Anal Chim Acta* 705:207–217
- Ramos D, Gonzalez-Rodriguez J, Zadora G, Aitken C (2013) Information-theoretical assessment of the performance of likelihood ratio computation methods. *J Forensic Sci* 58:1503–1518
- Silverman B (1986) Density estimation for statistics and data analysis. Chapman and Hall, London
- Walczak B (2000) Wavelets in Chemistry, (eds). Elsevier
- Walczak B, Massart D (1997) Noise suppression and signal compression using wavelet packet transform. *Chemometr and Int Lab Syst* 36:81–94
- Walczak B, Bogaert B, Massart D (1996) Application of wavelet packet transform in pattern recognition of near-IR data. *Anal Chem* 68:1742–1747
- Wee E, Grayden DB, Zhu Y, Petkovic-Duran K, Smith D (2008) A continuous wavelet transform algorithm for peak detection. *Electrophoresis* 29:4215–4225
- Zadora G, Neocleous T (2010) Evidential value of physico-chemical data-comparison of methods of database creation. *J Chemometr* 24:367–378
- Zadora G, Ramos D (2010) Evaluation of glass samples for forensic purposes—an application of likelihood ratios and an information-theoretical approach. *Chemometr Int Lab Syst* 102:63–83
- Zadora G, Neocleous T, Aitken C (2010) A two level model for evidence evaluation in the presence of zeros. *J Forensic Sci* 55:371–384
- Zadora G, Martyna A, Ramos D, Aitken C (2014) Statistical Analysis in Forensic Science Evidential Value of Multivariate Physicochemical Data. Wiley

Kraków, dnia 28 sierpnia 2017 r.

Oświadczenie

Oświadczam, iż w publikacji *Interpretation of FTIR spectra of polymers and Raman spectra of car paints by means of likelihood ratio approach supported by wavelet transform for reducing data dimensionality* opublikowanej w *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407 (2015) 3357-3376 mój udział polegał na:

- współpracy w formułowaniu hipotezy badawczej,
- przeprowadzeniu analiz materiałów polimerowych z wykorzystaniem spektrometrii w podczerwieni,
- zaproponowaniu metodologii umożliwiającej konstrukcję modeli ilorazu wiarygodności oraz przeprowadzeniu stosownych obliczeń,
- współpracy w ocenie i interpretacji wyników,
- tworzeniu publikacji i formułowaniu odpowiedzi na recenzje.

dr Agnieszka Martyna

Zakład Chemii Analitycznej
Instytut Chemii
Uniwersytet Śląski w Katowicach
ul. Szkolna 9, 40-003 Katowice

INSTYTUT EKSPERTYZ SĄDOWYCH

im. Prof. dra Jana Sehna

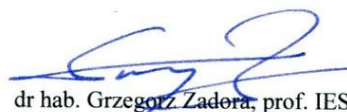
PL 31-033 Kraków, ul. Westerplatte 9
tel. (+48 12) 61 85 700, fax (+48 12) 422 38 50
e-mail: ies@ies.krakow.pl

Kraków, dnia 23 sierpnia 2017 r.

Oświadczenie

Oświadczam, iż w publikacji *Interpretation of FTIR spectra of polymers and Raman spectra of car paints by means of likelihood ratio approach supported by wavelet transform for reducing data dimensionality* opublikowanej w *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407 (2015) 3357-3376 mój udział polegał na:

- współpracy w formułowaniu hipotezy badawczej,
- ustaleniu ogólnej koncepcji badań,
- merytorycznym nadzorze procesu przygotowania publikacji,
- współpracy w ocenie i interpretacji wyników,
- pomocy przy tworzeniu publikacji, w procesie redakcyjnym i formułowaniu odpowiedzi na recenzje.



dr hab. Grzegorz Zadora, prof. IES

Instytut Ekspertyz Sądowych
im. Prof. dra Jana Sehna w Krakowie
ul. Westerplatte 9, 31-033 Kraków

Zakład Chemii Analitycznej
Instytut Chemii
Uniwersytet Śląski w Katowicach
ul. Szkolna 9, 40-003 Katowice

INSTYTUT EKSPERTYZ SĄDOWYCH

im. Prof. dra Jana Sehna

PL 31-033 Kraków, ul. Westerplatte 9
tel. (+48 12) 61 85 700, fax (+48 12) 422 38 50
e-mail: ics@ics.krakow.pl

Kraków, dnia 23 sierpnia 2017 r.

Oświadczenie

Oświadczam, iż w publikacji *Interpretation of FTIR spectra of polymers and Raman spectra of car paints by means of likelihood ratio approach supported by wavelet transform for reducing data dimensionality* opublikowanej w *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407 (2015) 3357-3376 mój udział polegał na:

- przeprowadzeniu analiz lakierów samochodowych z wykorzystaniem spektrometrii ramanowskiej,
- weryfikacji efektywności zaproponowanej metodologii interpretacji danych, odnoszących się do pomiarów ramanowskich,
- współpracy w interpretacji wyników odnoszących się do widm Ramana, w tym w wyborze zmiennych posiadających odpowiedni kontekst chemiczny,
- pomocy w tworzeniu publikacji i formułowaniu odpowiedzi na recenzje.

Aleksandra Michalska

Instytut Ekspertyz Sądowych
im. Prof. dra Jana Sehna w Krakowie
ul. Westerplatte 9, 31-033 Kraków

Publikacja 5

Tytuł:	Hybrid approach combining chemometrics and likelihood ratio framework for reporting the evidential value of spectra.
Autorzy:	Martyna A., Zadora G., Neocleous T., Michalska A. , Dean N.,
Czasopismo:	<i>Analytica Chimica Acta</i>
Wartość <i>Impact Factor</i> :	4,513
Punkty MNiSW:	45
Cytowana w rozprawie jako:	Martyna i in. 2016



Contents lists available at ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca

Hybrid approach combining chemometrics and likelihood ratio framework for reporting the evidential value of spectra



Agnieszka Martyna^{a, b}, Grzegorz Zadora^{b, c, *}, Tereza Neocleous^d, Aleksandra Michalska^b, Nema Dean^d

^a Jagiellonian University in Krakow, Faculty of Chemistry, Department of Analytical Chemistry, 3 Ingardena, Krakow 30-060, Poland

^b Institute of Forensic Research in Krakow, 9 Westerplatte, Krakow 31-033, Poland

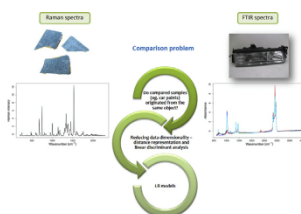
^c University of Silesia in Katowice, Institute of Chemistry, Chemometric Research Group, 9 Szkolna, Katowice 40-006, Poland

^d University of Glasgow, School of Mathematics and Statistics, 15 University Gardens, Glasgow G12 8QW, United Kingdom

HIGHLIGHTS

- The comparison problem of infrared spectra of polymers and Raman spectra of car paints was investigated for forensic purposes.
- Likelihood ratio with combination of chemometric tools for data compression was applied for reporting the evidential value.
- The differences between spectra expressed in the distance representation were captured using the linear discriminant analysis.
- False positive, false negative rates and empirical cross entropy plots were used for assessing the models performance.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 December 2015

Received in revised form

25 March 2016

Accepted 17 May 2016

Available online 24 May 2016

Keywords:

Dimension reduction

Likelihood ratio

Infrared and Raman spectroscopy

Polymer

Car paint

Forensic science

ABSTRACT

Many chemometric tools are invaluable and have proven effective in data mining and substantial dimensionality reduction of highly multivariate data. This becomes vital for interpreting various physicochemical data due to rapid development of advanced analytical techniques, delivering much information in a single measurement run. This concerns especially spectra, which are frequently used as the subject of comparative analysis in e.g. forensic sciences. In the presented study the microtraces collected from the scenarios of hit-and-run accidents were analysed. Plastic containers and automotive plastics (e.g. bumpers, headlamp lenses) were subjected to Fourier transform infrared spectrometry and car paints were analysed using Raman spectroscopy. In the forensic context analytical results must be interpreted and reported according to the standards of the interpretation schemes acknowledged in forensic sciences using the likelihood ratio approach. However, for proper construction of LR models for highly multivariate data, such as spectra, chemometric tools must be employed for substantial data compression. Conversion from classical feature representation to distance representation was proposed for revealing hidden data peculiarities and linear discriminant analysis was further applied for minimising the within-sample variability while maximising the between-sample variability. Both techniques enabled substantial reduction of data dimensionality. Univariate and multivariate likelihood ratio models

* Corresponding author. Institute of Forensic Research in Krakow, 9 Westerplatte, Krakow 31-033, Poland.

E-mail addresses: rzepecka@chemia.uj.edu.pl (A. Martyna), gzadora@ies.krakow.pl (G. Zadora), tereza.neocleous@glasgow.ac.uk (T. Neocleous), amichalska@ies.krakow.pl (A. Michalska), nema.dean@glasgow.ac.uk (N. Dean).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2016.05.016>

0003-2670/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

were proposed for such data. It was shown that the combination of chemometric tools and the likelihood ratio approach is capable of solving the comparison problem of highly multivariate and correlated data after proper extraction of the most relevant features and variance information hidden in the data structure.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Recent developments in the field of instrumental analytical chemistry enable recording of many physicochemical features which extensively characterise the analysed samples in one single measurement. Spectroscopic methods are examples of such. Such techniques, generating the signal reflecting the nature of interaction between sample and light (e.g. intensity of absorbed, scattered or reflected light), are frequently applied for investigating the chemical features (e.g. functional groups) of the samples, often with complex chemical composition of the matrices.

Many scientific fields consider spectroscopic data as the basis of comparative analysis. It is also the case in the forensic sciences, where spectroscopy is employed for characterising for example plastics used for car body elements production (e.g. bumpers, headlamp lenses) and automotive paints collected from the scenarios of hit-and-run car accidents. Fourier transform infrared spectrometry (FTIR) can be applied for characterising organic compounds of polymers while Raman spectroscopy (RS) may be utilized for pigment identification in car paints. For making inferences about the connections between the scene of a car accident and the suspected car, the spectra of the material collected from the car accident scenario (so-called recovered samples, whose source is unknown) are compared with the spectra of the known-source control material collected e.g. from the suspected car. Even though forensic scenarios are the illustrative examples used here in discussing the methodology for solving the so-called comparison problem, the workflow may be utilized in any field of chemistry, where the issue of comparing physicochemical features is raised. Moreover, any scientist with a specialist knowledge in some field can be asked by the court representatives to express an opinion on the casework. The analytical results must then be interpreted and reported according to the standards of the interpretation schemes acknowledged in forensic sciences [1].

Visual overlying of the spectra is unfortunately still the most frequent method for commenting on their similarity. However, despite focusing on the discrepancies in the spectra's general shapes and location of absorption bands, peaks etc., such a naked-eye comparison can only be credible for visually distinguishable spectra. In the case of very similar spectra, the resulting conclusion must be supported by more reliable tools. Moreover, when the comparison problem is addressed in the forensic sciences, the evidential value of the observed similarities and differences in the spectra must be reported. This can be expressed by the likelihood ratio (LR) approach, being a well documented method for assessing the evidential value of the physicochemical data [2–4].

LR expresses the data in the context of two contrasting hypotheses. In the comparison problem they may state that:

- H_1 : compared recovered and control materials come from the same source (e.g. suspected car),
- H_2 : compared recovered and control materials do not come from the same source.

Due to its dichotomic nature, LR can be regarded as a reliable

and objective test for making inference about the common provenance of the compared samples based on their physicochemical data by investigating the data from two contrasting perspectives given by the LR expression:

$$LR = \frac{\Pr(E|H_1)}{\Pr(E|H_2)} \quad (1)$$

Values of LR above 1 support H_1 , while values of LR less than 1 support H_2 . A value of LR equal to 1 does not provide support for either proposition. The strength of support towards each of the hypotheses is determined by the LR value itself. The larger (lower) the value of LR, the stronger the support for H_1 (H_2).

When the LR is computed for original features such as for instance elemental content of the samples (so called feature-based approach) it accounts for:

- the similarity of the features,
- the rarity of the observed features,
- the sources of uncertainty including the within- and between-object (sample) variability in the relevant population (e.g. plastics or car paints),
- correlation between the measured features.

Including the rarity information is what makes the LR approach more suitable for assessing the evidential value than any other tests for comparing two datasets such as the *t*-test. The LR assigns greater support for the relevant hypothesis when the similarity is observed between rare features than when it is detected for quite common characteristics. It is worth noting that for the models in which features are replaced by e.g. distances between samples (so called score-based approach [5–7]) the rarity refers rather to the frequency of observing a particular distance than a feature.

LR models are widely developed and easily constructed for data sets described by a limited number of variables such as in the case of glass fragments characterised by their elemental composition [3] concerning only oxygen, sodium, magnesium, aluminium, silicon, potassium, calcium and iron. Similarly to most of the methods strongly embedded in statistics, LR also reveals some limitations when dealing with highly multidimensional data, such as spectra. The main problem relates to the inability to reliably estimate the relevant parameters for LR calculations (means, variances, covariances) for data sets consisting of less samples than the number of variables they are described by. This issue is known as the *curse of dimensionality*.

Representing the spectra in the form of the so-called peaks table comprising of the areas below the limited number of spectra peaks is the easiest way for reducing their dimensionality [8]. However, this method seems to be quite time-consuming and too subjective, causing some troubles especially when establishing the boundaries of the peaks. Moreover, for some spectroscopic methods it becomes difficult to exactly identify the chemical compound responsible for the specific peak appearance.

A more convenient solution may be investigation of the dependencies between variables allowing for grouping them in clusters of highly correlated variables. This idea is the basis of

graphical models, which in the forensic field are extensively used for glass elemental composition data [3,9,10]. In the presented approach the multidimensional problems were split into multiple problems of lower dimensions, for which LR models are more credible. However, the applied methodology is only successful for physicochemical data sets described by only a few variables [3,11]. Even though application of graphical models is reported also for highly multivariate data [12,13], the LR models based on their outcomes may not be reliable enough for legal processing.

The so-called *naïve* LR approach [14,15] was also applied to various kinds of physicochemical data described by many variables. It assumes that the final LR value can be easily computed by multiplying all univariate LR values based on each of the variables. The justified criticism of this approach stems from the fact that it ignores the correlations between the variables. The issues with this misuse are more severe, the higher the correlation is.

In contrast to pure statistical tools, chemometrics enable investigators to extract the most relevant features from complex structured data in the original multidimensional space and represent them compactly in the form of a limited number of variables. Therefore, the application of chemometric tools in forensic science has been gaining importance in recent years [14–20]. In spite of their usefulness in the field of data mining, outcomes of chemometric tools cannot be directly translated and interpreted for forensic purposes, as they do not always account for all essential aspects listed above (e.g. physicochemical features rarity information, within- and between-object sources of variability and correlation structure). These, in turn, are addressed in likelihood ratio approach. However, to the authors' best knowledge, hardly any publications can be found in the literature that discuss the issue of an application of LR models accompanied by chemometric tools for highly multidimensional data such as spectra.

In Ref. [21] wavelets [22–24] were proposed for representing the spectra in a shorter form of reduced number of wavelet transform coefficients, for which univariate and multivariate LR models were constructed. The method focuses on the local spectra features as for example bands associated with particular bond vibrations, which are especially important from the chemical perspective. Limiting the relevant spectra features to those extracted from the wavelet transform may preserve sufficient information by keeping the spectra original shape deprived of irrelevant details. Even though the wavelet transform was effective in solving the comparison problem of spectra within FTIR database of polypropylene samples and Raman spectra database of car paints [21], the authors aim to study other chemometric methods also regarded as useful in dealing with high dimensionality data.

In this work, various aspects of hidden data structure were addressed using a sequence of chemometric techniques, the outcome of which was adopted as the input for LR models. The studies presented herein were aimed at verifying the suitability of joining distance representation and linear discriminant analysis for generating lower dimensional data without ignoring relevant data features. The objective was to construct LR models for the comparison problem of FTIR spectra for polypropylene and Raman spectra of solid and metallic car paints. The presented LR model can be viewed as a hybrid between feature and score based models, as each object becomes described by a set of distances (scores) from the reference samples, acting now as new features. For clarity, the computed scores do not refer to the pairwise distances between compared samples, but constitute vectors of characteristics describing the proximity of each sample to the preselected prototypes (section 2.2.2). Moreover it is worth noting that linear discriminant analysis, a method developed and commonly used for classification, is applied here to the comparison problem.

2. Materials and methods

2.1. Samples and equipment

Eleven polypropylene samples (also containing traces of other compounds such as polyethylene) used for the production of car body elements (e.g. bumpers, headlamp lenses) were the subject of Fourier transform infrared spectrometry analysis. Additionally FTIR spectra were recorded for 13 polypropylene containers which were packages for products commonly used in our daily lives (e.g. cosmetics). Due to the high probability of their occurrence on the scene of investigation (e.g. car accident), they supplemented the database. The true distribution of the non-vehicle and vehicle samples is unknown, however, more or less equal proportions for both groups were assumed. To the authors' best knowledge there is no substantial difference between the frequency of collecting the automotive plastics and containers found on the scene of car accident. Both materials are more or less equally likely to occur, which is the assumption followed in the research.

The FTIR signal was collected in the range 600–4000 cm^{-1} and for the purpose of calculations was limited to only 700–3000 cm^{-1} , capturing all the relevant chemical information. The equipment used was an FTS 40Pro Fourier transform infrared spectrometer (Bio-Rad/Digilab, Marlborough, MA), coupled with a UMA 500 microscope. For each of the 24 samples three FTIR spectra in the transmission mode were recorded from four distinct parts of the samples (with a total of $n = 12$ measurements per sample).

Thirty solid and 30 metallic blue car paints originating from bodies of damaged cars were subjected to Raman spectroscopy using a Renishaw inVia spectrometer equipped with a Leica microscope and near infrared semiconductor laser (785 nm) as an excitation source. The laser beam was focused on samples by 50 \times (NA = 0.75) objective lens, which gives a theoretical spot size of approximately 2 μm . The laser power applied while recording Raman spectra used 1% or 0.5% of its maximum power (300 \pm 30 mW). The spectrometer collected light in the back-scattering mode, which was dispersed on a 1200 grooves/mm grating and was focused on a Peltier-cooled charged coupled device (CCD). Spectral data was processed with Renishaw Wire 3.2 software. Spectra of all samples were recorded in situ in the region of 200–2500 cm^{-1} with an acquisition time of 10 s and collection of five accumulations. For the purpose of the calculations within this research the spectrum range was finally limited to 380–2300 cm^{-1} , which still covered all the relevant pigments Raman bands. Each paint sample was measured in three to seven spots.

2.2. Chemometric and statistical tools

The comparison problem of the recorded spectra was addressed for samples within each of the three databases:

1. 24 \times 12 = 288 FTIR spectra recorded for 24 polypropylene samples (containing some additional compounds, e.g. polyethylene) from car body parts (headlamp lenses, bumpers) and plastic containers,
2. 100 Raman spectra recorded for 30 blue solid automotive paints,
3. 97 Raman spectra recorded for 30 blue metallic automotive paints.

2.2.1. Signal preprocessing

2.2.1.1. FTIR polypropylene spectra. For the sake of making all of the spectra comparable (Fig. 1a) despite the varying thicknesses of samples, each of the 288 FTIR spectra recorded for 24 polypropylene samples in the range 700–3000 cm^{-1} was normalised

using the standard normal variate (SNV) method [25]. SNV was proposed as a normalisation technique due to its independence of the whole database in contrast to other often applied techniques such as multiplicative scatter correction or probabilistic quotient normalisation [25].

2.2.1.2. Raman solid and metallic car paints spectra. Each single recorded Raman spectrum constituted the set of data points measured for a series of wavenumbers. Due to indelible instrumental settings, the set of wavenumbers by which Raman signal intensities were measured differed between spectra. The sequence demonstrated changeable starting and ending points and varying step between subsequent elements. Such an inconvenience precludes the application of various statistical or chemometric methods aiming at interpreting the spectra similarity as they are only suitable for making inferences when samples are described by the same sets of variables (here: wavenumbers). This needed to be sorted out by reconstructing the spectra so that they reflect the Raman signal intensities measured by equally spaced wavenumbers, consistent between spectra. 1024 data points sampled every ca. 2.053 cm^{-1} were supposed to be generated in the reconstructed spectra spanning the range of $200\text{--}2300 \text{ cm}^{-1}$. Spline functions [26] with cubic polynomials were used for interpolating (fitting) the spectrum and finding the Raman intensities for the new set of 1024 equally spaced wavenumbers.

Most of the Raman spectra were distorted by a fluorescence effect lifting the baseline, which made them difficult to interpret. To deal with the problem, the continuous wavelet transform (CWT) was applied for each of the analysed spectra separately (Fig. 1b). Thanks to the CWT properties, the true signal can be successfully separated from the low frequency background (mainly attributed to the fluorescence effect) [27]. The baseline drift of each individual spectrum was removed using the Mexican hat wavelet [22] with the same set of CWT parameters for each spectrum (Fig. 1b). The reason for creating the number of 1024 points per spectrum in the reconstruction step was the CWT, which operates on 2^N long signals.

For the sake of calculations the spectra were limited to the range $380\text{--}2300 \text{ cm}^{-1}$ in order to exclude the initial part of spectrum for which CWT hardly managed to separate the baseline from the true signal. They were then normalised using the standard normal variate (SNV) method.

2.2.2. Reduction of data dimensionality

Each of the three databases consists of m objects (for FTIR

spectra it is $m_R = 24$, for solid and metallic Raman spectra databases $m_R = 30$), each measured n_i times (n_i is constant, $n = 12$, for FTIR spectra database and differs between 3 and 7 in Raman spectra databases) and described by v variables (understood as signal intensities measured for a set of v wavenumbers). After preprocessing steps (see section 2.2.1) the FTIR polypropylene spectra database is a matrix of size $288 \text{ spectra} \times 1193 \text{ variables}$ (signal intensities measured by 1193 wavenumbers), the solid car paints Raman spectra database is a matrix of size 100×936 and the metallic car paints Raman spectra database is a matrix of size 97×936 .

The most natural and powerful way for reducing the dimensionality of physicochemical data is by principal component analysis (PCA). Despite its great capability for effective dimension reduction, the main disadvantage of PCA is that it fails in distinguishing between the within- and between samples variability as illustrated in Fig. 2. Its aim is to search for the directions that maximise the overall variance of the data without considering any division into various objects described by multiple spectra (dashed red line in Fig. 2). As a consequence the generated space is not optimal for maximising the between-object variability while minimising the within-object variability. Since LR models perform effectively only when the between-object variance is much greater than the within-object variance, preserving the relation $\mathbf{C} \gg \mathbf{U}$ is crucial from the perspective of LR model efficacy. Here \mathbf{C} denotes the between-sample variance-covariance matrix (Equation (6)) and \mathbf{U} the within-sample variance-covariance matrix (Equation (5)). Otherwise, the distributions of the variables describing objects

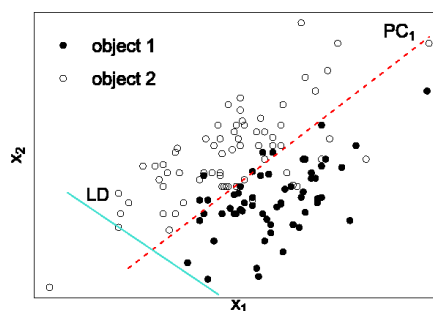


Fig. 2. The illustration of differences between the variance aspects PCA and LDA address.

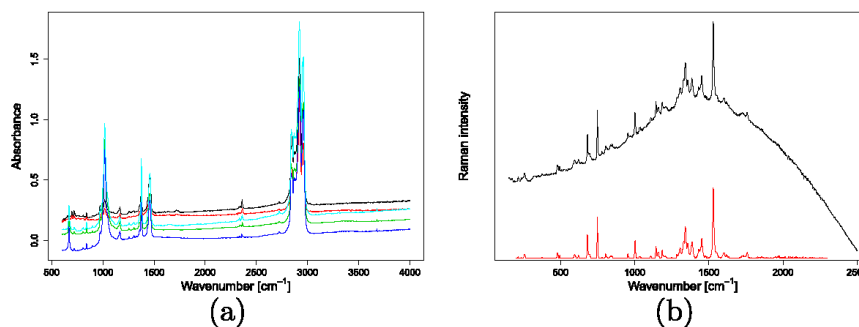


Fig. 1. Examples of (a) FTIR polypropylene spectra, (b) Raman solid car paint spectrum before (black) and after (red) the baseline removal using the continuous wavelet transform. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

overlap, making it difficult to distinguish between them.

Furthermore a dataset of samples' characteristic features (e.g. in the form of spectra) may not always be the most straightforward and informative. Dealing with so many variables (features) as the number of wavenumbers for which intensities of spectroscopic signals were measured is both inconvenient and prevents easy observation of the genuine spectra similarities and differences. As suggested in Refs. [28–30] the so-called distance representation has many advantages over classical feature representation. It not only enables for substantial data compression, but also easily copes with the non-linear problems [28]. Nevertheless, the methodology causes some information loss especially regarding the influence of the original features on the results but it is always a matter of finding a compromise between losing some information and reducing data dimensionality so that they are adjusted to further processing steps. Applying data dimensionality reduction techniques may deteriorate the results when applied prior to the classification [31], however, in the case of spectra initial data dimensionality reduction is absolutely inevitable as without this step hardly any method for their evaluation can be used, the likelihood ratio approach least of all. Therefore using distance representation instead of feature space must be considered as a *quid pro quo* methodology, which is assumed to preserve enough information for solving the stated problem.

In the distance representation approach, each sample is described by the distance measure (Manhattan, Euclidean, etc.) from the predefined reference samples (e.g. mean spectrum, reference material spectrum). Then the matrix originally containing P wavenumbers by which intensities were measured for M spectra (matrix size $M \times P$) is reduced to a matrix of $M \times R$, where R stands for the number of reference samples spectra the distances are measured to. In distance representation each sample (spectrum) is described by features that are its distances to the reference objects. In the presented research the suitability of five different distance metrics including Manhattan, Euclidean, squared Euclidean, correlation-based and Chebyshev distance was examined. The correlation based distance metric between two spectra A and B is calculated as $1 - r_{AB}$, where r_{AB} is the Pearson's correlation coefficient between the two spectra. For this reason the values it takes fall between 0 and 2, whereas the remaining considered distance metrics produce non-negative values.

However, for meeting the condition of much greater between-than within-object variability, $C \gg U$, linear discriminant analysis (LDA) [32] was applied to data in distance representation prior to LR models construction. Even though the method is known for classification purposes, it can be successfully applied for maximising the ratio of between-to within-object variabilities (instead of between-to within-class variabilities) when objects are regarded as separate classes. Such an approach enables finding the best direction in which the variance related to the differences between objects is captured and the random within-object variability is diminished (solid blue line in Fig. 2). LDA can be used for compressing data as new directions are found in the sequence of decreasing ratio of between-to within-classes (here objects) variance. Therefore accounting for the first few LDs will enable capturing the greatest part of variance associated with data grouping. LDA has also one more advantage stemming from the fact that eigenvectors (LDA directions) are scaled to generate unit within-object variances. This is seen as an additional merit, since LR models also assume the same constant within-object variance for all objects.

As a consequence, LDA enabled further substantial reduction of data dimensionality in distance representation. The projections of the data on linear discriminant directions were further considered as variables for LR models construction.

According to the mathematical principles of LDA, the projections representing the spectra in the LDA space are both orthogonal and uncorrelated. This property enables adopting the easiest solution to create multivariate LR models (section 2.2.3). The idea is to convert the p -dimensional problem into p univariate models. The solution involves the construction of univariate LR models based on single linear discriminants (LDs) and their multiplication for getting the final LR value (Figs. 3 and 4, Equations (2)–(4)). Such an approach is known as *naïve*, in which it is assumed that the contribution of each of the variables in the support for the relevant hypothesis (H_1 or H_2) is independent of the other variables. Its only limitation relates to the assumption of the lack of correlation between the variables and escalates with increasing correlation [6,18]. However, for the examined data, the assumption still holds thanks to orthogonalisation and centering of the LDA space. The *naïve* LR models constructed from LDs are only reasonable when they account for the LDs with the greatest ability to distinguish between all samples. For selecting such LDs the algorithm proposed by Raftery and Dean in Ref. [33] was applied. It is based on the use of the Bayes factor and Bayesian Information Criterion (BIC) for selecting the variables with the greatest ability to put each single sample into a separate group [33,34]. The algorithm selects LDs by iteratively proposing keeping/removing an LD one at a time. Through a stepwise procedure, each LD is considered for retention or removal from consideration given the set of LDs already retained. BIC scores are used to compare the model where the LD under consideration is assumed to show clustering in the data (where clustering indicates grouping replicate measurements of samples into groups which are regarded as separate samples) along with the other currently retained LDs and the competing model where the already retained LDs provide clustering but the LD under consideration has a non-clustering model. This comparison basically indicates whether the new LD provides an improvement in separating the samples over and above the LDs already selected. Since the same set of LDs is being used in both models, the BIC scores can be compared and the model that represents the best BIC score will indicate the relevant decision to be made regarding retention or removal of the LD of interest. Iterating this procedure until convergence results in a set of selected LDs.

The studies examined the performance of the following *naïve* LR models:

- univariate LR models:

$$LR(LD_{BIC_1}) \quad (2)$$

- bivariate LR models:

$$LR(LD_{BIC_1}) \cdot LR(LD_{BIC_2}) \quad (3)$$

- trivariate LR models:

$$LR(LD_{BIC_1}) \cdot LR(LD_{BIC_2}) \cdot LR(LD_{BIC_3}) \quad (4)$$

2.2.2.1. Validation of the procedure. Two different approaches were applied for creating the training and test sets for validation purposes (Fig. 3):

- for the FTIR polypropylene spectra database there were $s = 100$ training and test sets randomly generated using the *leave-p-out* method. In each iteration 4 randomly selected spectra from each of the m_{IR} samples were averaged and constituted a set of m_{IR}

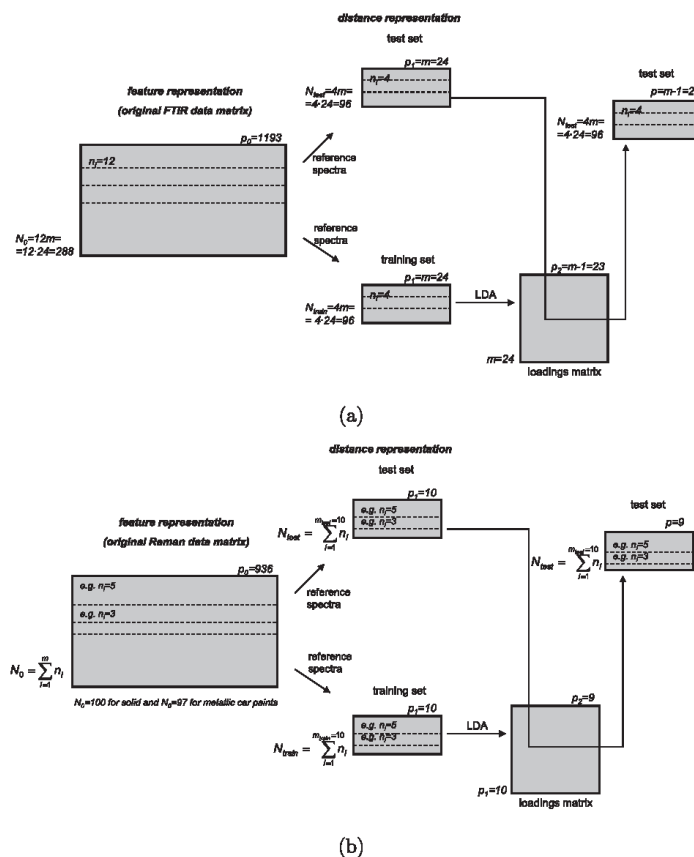


Fig. 3. The scheme illustrating the validation procedure for (a) FTIR polypropylene spectra database, (b) Raman solid or metallic car paints databases. Notation: m —number of objects, N_0 —number of original spectra in the considered FTIR and Raman spectra databases (subscripts *test* and *train* refer to the test and training sets respectively), n_i —number of multiple spectra recorded for each of m samples (constant for FTIR spectra database, $n_i = 12$ and varying between 3 and 7 for Raman spectra databases), p —number of variables considered at each step indicated by a subscript.

reference spectra. Another 4 randomly selected spectra recorded for each of the m_{LR} samples formed the training set for LDA space construction. The remaining 4 from each sample formed the test set for LR models (Fig. 3a). Both training and test sets consisted of $m = 24$ exactly the same samples, but different measurements. Finally, the test and training sets in distance representation were matrices of size $4 \cdot 24 = 96 \times 24$ since the distances from 96 spectra were computed to 24 averaged reference spectra. LDA performed on the training set reduced the number of variables to the minimum of the number of groups (here samples, whose number is equal to 24) minus one and the number of variables, which is 24. This produces $24 - 1 = 23$ new orthogonal features. The final test set matrix used in the LR calculations was developed by applying the LDA model parameters on the distance representation of the test set spectra and was described by 96 rows referring to the spectra of the 24 samples and 23 columns referring to linear discriminant directions acting as new variables.

- for the Raman car paints spectra databases, due to limited and differing number of spectra recorded for each car paint sample (so-called unbalanced data), the validation sets were constructed in a samples-driven way. Ten samples spectra were randomly selected and averaged to create 10 reference spectra, the training set consisted of 10 randomly selected car paint samples (with all their spectra) and the 10 samples left formed the test set (Fig. 3b). Such test and training sets were created $s = 100$ times. Since the number of spectra recorded for each sample (n_i) differs, the dimensionalities of test and training sets are not straightforward. Nevertheless, the test and training sets in distance representation were matrices of size $10 \cdot n_i \times 10$ since the distances from $10 \cdot n_i$ spectra were computed to 10 averaged reference spectra. LDA performed on the training set reduced the number of variables to the minimum of the number of groups (here samples, whose number is equal to 10) minus one and the number of variables, which is 10. This produces $10 - 1 = 9$ new orthogonal features. The final test set matrix was developed by applying the LDA model parameters on the

40

A. Martyna et al. / Analytica Chimica Acta 931 (2016) 34–46

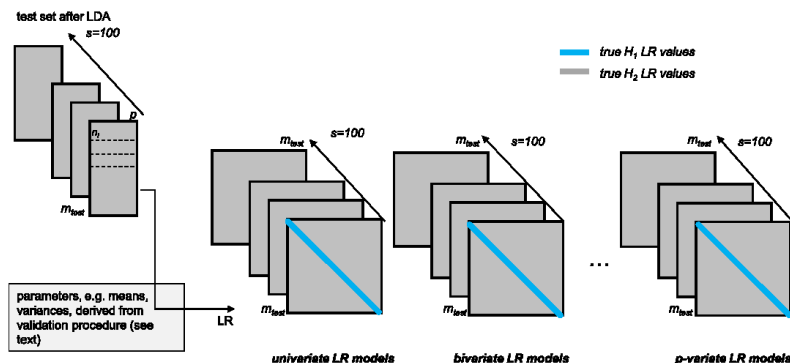


Fig. 4. The structure of the symmetric matrices of LR results (size $m_{test} \times m_{test}$, where m_{test} refers to the number of objects in the test set of FTIR or Raman spectra databases after LDA, Fig. 3) obtained for each of the $s = 100$ test sets within particular naïve LR models. The diagonals of the matrices archive the true H_1 LR values (expected to be greater than 1) for comparing the objects sharing the same origins (estimation of false negative answers), whereas gray areas below or above the diagonals store the true H_2 LR values (expected to be lower than 1) for comparing the objects with different origins (estimation of false positive answers). n_i refers to the number of multiple spectra recorded for each of m_{test} samples (constant for FTIR spectra database, $n_i = 12$, and varying between 3 and 7 for Raman spectra databases), p denotes the number of variables considered after performing LDA.

distance representation of the test set spectra and was described by $10 \cdot n_i$ rows referring to the spectra of the 10 samples and 9 columns referring to the linear discriminant directions acting as new variables.

The relevant dimensionality of the FTIR and Raman databases in the distance representation and after performing LDA is given schematically in Fig. 3. From now on these matrices of lower dimensions will serve as databases for LR models construction (Fig. 4).

2.2.3. Likelihood ratio

In each of $s = 100$ iterations (for validating LDA models) one final test set was constructed separately for FTIR and Raman databases. This test set is supposed to be the foundation for LR models construction. For validating the LR models new training and test sets were derived from the final test sets of FTIR and Raman data matrices after performing LDA on the spectra distance representation. When different samples were under comparison, they constituted a single LR test set. The corresponding LR training set for estimating the LR models parameters (means, variances, covariances) consisted of the remaining samples. The procedure was repeated until all possible comparisons in the database were completed (including comparison of data for the two samples coming from the same object). New defined LR test and training sets will be denoted with relevant subscripts.

Each i -th ($i = 1, \dots, m_{train}$) object from the training set is described by n_i vectors ($j = 1, \dots, n_i$) containing data of p variables being projections of distance representations of spectra on the linear discriminants, $\mathbf{x}_{ij} = (x_{ij1}, \dots, x_{ijp})^T$. Their number is equal to $p = m = 24$ for FTIR spectra database and $p = 10$ for Raman spectra databases.

The mean vector of p variables for each object is given as $\bar{\mathbf{x}}_i = \frac{1}{n_i} \sum_{j=1}^{n_i} \mathbf{x}_{ij}$.

The overall mean μ is estimated from $\bar{\mathbf{x}} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^{m_{train}} n_i \bar{\mathbf{x}}_i$, where $N = \sum_{i=1}^{m_{train}} n_i$.

The distribution of \mathbf{x}_{ij} given $\bar{\mathbf{x}}_i$ is assumed normal and characterised by the within-object variance \mathbf{U} that is equal for all objects: $(\mathbf{x}_{ij} | \bar{\mathbf{x}}_i, \mathbf{U}) \sim N(\bar{\mathbf{x}}_i, \mathbf{U})$.

The within-object variance-covariance estimate ($\hat{\mathbf{U}}$) is expressed by:

$$\hat{\mathbf{U}} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^m \frac{n_i}{n_i - 1} \mathbf{S}_{wi}, \quad (5)$$

where:

$$\mathbf{S}_{wi} = \sum_{j=1}^{n_i} (\mathbf{x}_{ij} - \bar{\mathbf{x}}_i)(\mathbf{x}_{ij} - \bar{\mathbf{x}}_i)^T.$$

The object means $\bar{\mathbf{x}}_i$ are distributed around μ estimated as $\bar{\mathbf{x}}$ with dispersion given by the between-object variability (\mathbf{C}). The distribution can be assumed normal $(\bar{\mathbf{x}}_i | \mu, \mathbf{C}) \sim N(\mu, \mathbf{C})$ or is estimated by kernel density estimation (KDE) procedure using Gaussian kernels with bandwidth parameter calculated as $h = (4 / (m_{train}(2p + 1)))^{1/(p+4)}$ [35].

The between-object variance-covariance estimate ($\hat{\mathbf{C}}$) is expressed as:

$$\hat{\mathbf{C}} = \frac{N}{N^2 - \sum_{i=1}^{m_{train}} n_i^2} (\mathbf{S}_b - (m_{train} - 1) \hat{\mathbf{U}}), \quad (6)$$

where:

$$\mathbf{S}_b = \sum_{i=1}^{m_{train}} n_i (\bar{\mathbf{x}}_i - \bar{\mathbf{x}})(\bar{\mathbf{x}}_i - \bar{\mathbf{x}})^T.$$

LR models constructed using the parameters ($\mathbf{U}, \mathbf{C}, \mu, \bar{\mathbf{x}}_i, \bar{\mathbf{x}}, h$) estimated from the training set are subsequently applied for comparing each two objects from the test set, known as recovered and control samples.

For control object \mathbf{y}_1 there are k_1 observations of the p variables:

$$\mathbf{y}_{1j} = (y_{1j1}, \dots, y_{1jp})^T$$

with mean vector $\bar{\mathbf{y}}_1 = \frac{1}{k_1} \sum_{j=1}^{k_1} \mathbf{y}_{1j}$, coming from normal distribution $(\bar{\mathbf{y}}_1 | \mu, \mathbf{U}, \mathbf{C}) \sim N(\mu, \frac{\mathbf{U}}{k_1} + \mathbf{C})$.

For recovered object \mathbf{y}_2 there are k_2 observations of the p variables:

$$\mathbf{y}_{2j} = (y_{2j1}, \dots, y_{2jp})^T$$

with mean vector $\bar{\mathbf{y}}_2 = \frac{1}{k_2} \sum_{j=1}^{k_2} \mathbf{y}_{2j}$, coming from normal distribution $(\bar{\mathbf{y}}_2 | \mu, \mathbf{U}, \mathbf{C}) \sim N(\mu, \mathbf{U}/k_2 + \mathbf{C})$.

The weighted mean of $\bar{\mathbf{y}}_1$ and $\bar{\mathbf{y}}_2$ is given as $\bar{\mathbf{y}}^* = (k_1 \bar{\mathbf{y}}_1 + k_2 \bar{\mathbf{y}}_2) / (k_1 + k_2)$ and comes from normal distribution $(\bar{\mathbf{y}}^* | \mu, \mathbf{U}, \mathbf{C}) \sim N(\mu, \mathbf{U}/k_1 + k_2 + \mathbf{C})$.

In the case of univariate data, all matrices or vectors in LR expressions become scalars, e.g. \mathbf{U} becomes u^2 and $\bar{\mathbf{x}}$ is reduced to \bar{x} .

In the LR numerator it is assumed that the compared samples originate from the same object (H_1). Thus, it can be shown that the numerator can be expressed by explicitly taking into account the evaluation of the difference of physicochemical data between compared objects, as well as their rarity, the latter being expressed by the distance of the weighted mean $\bar{\mathbf{y}}^*$ from the overall mean $\bar{\mathbf{x}}$.

Therefore, when kernel density estimation is applied for modelling the between-object distribution, the numerator could be expressed by Refs. [2,4,36]:

$$\begin{aligned} f(\bar{\mathbf{y}}_1, \bar{\mathbf{y}}_2 | \mathbf{U}, \mathbf{C}, \bar{\mathbf{x}}, H_1) &= f(\bar{\mathbf{y}}_1 - \bar{\mathbf{y}}_2 | \mathbf{U}, H_1) \times \frac{1}{m_{train}} \sum_{i=1}^{m_{train}} K(\bar{\mathbf{y}}^* | \bar{\mathbf{x}}_i, \mathbf{U}, \mathbf{C}, h, H_1) \\ &= (2\pi)^{-p/2} \left| \frac{\mathbf{U}}{k_1} + \frac{\mathbf{U}}{k_2} \right|^{-\frac{1}{2}} \exp \left\{ -\frac{1}{2} (\bar{\mathbf{y}}_1 - \bar{\mathbf{y}}_2)^T \left(\frac{\mathbf{U}}{k_1} + \frac{\mathbf{U}}{k_2} \right)^{-1} (\bar{\mathbf{y}}_1 - \bar{\mathbf{y}}_2) \right\} \times \\ &\times (2\pi)^{-p/2} \left| \frac{\mathbf{U}}{k_1 + k_2} + h^2 \mathbf{C} \right|^{-\frac{1}{2}} \frac{1}{m_{train}} \sum_{i=1}^{m_{train}} \exp \left\{ -\frac{1}{2} (\bar{\mathbf{y}}^* - \bar{\mathbf{x}}_i)^T \left(\frac{\mathbf{U}}{k_1 + k_2} + h^2 \mathbf{C} \right)^{-1} (\bar{\mathbf{y}}^* - \bar{\mathbf{x}}_i) \right\}. \end{aligned} \quad (7)$$

In the denominator of the likelihood ratio, $\bar{\mathbf{y}}_1$ and $\bar{\mathbf{y}}_2$ are taken to be independent as the data are assumed to originate from different objects (H_2). When KDE is applied for modelling the between-object distribution, it takes the form [2,4,36]:

$$\begin{aligned} f(\bar{\mathbf{y}}_1, \bar{\mathbf{y}}_2 | \mathbf{U}, \mathbf{C}, \bar{\mathbf{x}}, H_2) &= \frac{1}{m_{train}} \sum_{i=1}^{m_{train}} f(\bar{\mathbf{y}}_1 | \bar{\mathbf{x}}_i, \mathbf{U}, \mathbf{C}, h, H_2) \times \frac{1}{m_{train}} \sum_{i=1}^{m_{train}} f(\bar{\mathbf{y}}_2 | \bar{\mathbf{x}}_i, \mathbf{U}, \mathbf{C}, h, H_2) \\ &= (2\pi)^{-p/2} \left| \frac{\mathbf{U}}{k_1} + h^2 \mathbf{C} \right|^{-\frac{1}{2}} \frac{1}{m_{train}} \sum_{i=1}^{m_{train}} \exp \left\{ -\frac{1}{2} (\bar{\mathbf{y}}_1 - \bar{\mathbf{x}}_i)^T \left(\frac{\mathbf{U}}{k_1} + h^2 \mathbf{C} \right)^{-1} (\bar{\mathbf{y}}_1 - \bar{\mathbf{x}}_i) \right\} \\ &\times (2\pi)^{-p/2} \left| \frac{\mathbf{U}}{k_2} + h^2 \mathbf{C} \right|^{-\frac{1}{2}} \frac{1}{m_{train}} \sum_{i=1}^{m_{train}} \exp \left\{ -\frac{1}{2} (\bar{\mathbf{y}}_2 - \bar{\mathbf{x}}_i)^T \left(\frac{\mathbf{U}}{k_2} + h^2 \mathbf{C} \right)^{-1} (\bar{\mathbf{y}}_2 - \bar{\mathbf{x}}_i) \right\}. \end{aligned} \quad (8)$$

2.2.4. Assessing the LR models performance – false positive and false negative rates and empirical cross entropy approach

When constructing new LR models, special care should be taken for assessing their performance and the correctness of the yielded results. Providing the levels of correct LR models responses belongs to the most coarse methods for commenting on the LR models effectiveness. In the proposed research the levels of false positive and false negative answers were under examination [4]. For their estimation the following comparisons were simulated:

- (1) LR is computed for two samples sharing common origin, i.e. one sample from the test set was split into two samples (one acting as recovered and the second one as control sample). The samples with even number of spectra were divided into two equally numerous parts. For samples with odd number of spectra, the control sample consisted of one more observation than the recovered one. The correct model response should support H_1 (hence $LR > 1$). Each value of $LR < 1$ is then a false negative answer. The number of comparisons performed within this experiment is then $N_1 = m_{IR} = 24$ for each of $s = 100$ test sets of FTIR polypropylene spectra and $N_1 = m_{R,test} = 10$ for Raman spectra databases.
- (2) LR is computed for each two objects from the test set. Since they do not share common origin, H_2 should be supported (hence $LR < 1$) and each value supporting the H_1 ($LR > 1$) is known as the false positive answer. Total number of the comparisons performed in this experiment for each of $s = 100$ test sets is given by $N_2 = m_{IR} \cdot (m_{IR} - 1) / 2 = 24 \cdot (24 - 1) / 2 = 276$ for each test set of FTIR polypropylene spectra and

$$N_2 = m_{R,test} \cdot (m_{R,test} - 1) / 2 = 10 \cdot (10 - 1) / 2 = 45 \text{ for Raman spectra databases.}$$

When considering only the levels of false positive and false negative answers, the information concerning the strength of the

support for particular hypothesis is hidden. For instance, false positive answers of $LR = 5$ and $LR = 500$ are both regarded in favour of H_1 , even though the strength of the support towards this hypothesis varies significantly for both values. Therefore, information on false positive and false negative rates is usually insufficient for portraying an extensive and credible assessment of the performance of the LR models.

In hypothesis testing it is not only desirable to support the correct hypothesis but also that this support should be as strong as possible (i.e. $LR \gg 1$ when H_1 is correct and $LR \ll 1$ when H_2 is

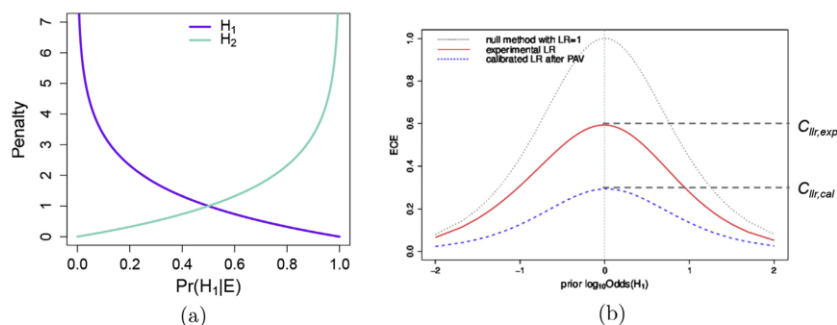


Fig. 5. (a) Logarithmic strictly proper scoring rules, (b) empirical cross entropy (ECE) plot (description in the text).

correct). If an incorrect hypothesis is supported by LR value (i.e. $LR < 1$ when H_1 is true and $LR > 1$ when H_2 is true) then LR value should concentrate around 1, supporting the incorrect hypothesis very weakly. Therefore LR models, capable of pointing out the strength of support towards one of the hypotheses, should be extensively exploited by taking advantage of this information, instead of only the indication of the supported hypothesis. This information is crucial from the perspective of Bayesian theory (Equation (9)), in which LR values modify the prior assumptions ($\Pr(H_1)$ and $\Pr(H_2)$) about the evidence stated before its analysis. Such a modification generates final results in the form of ratio of conditional probabilities $\Pr(H_1|E)$ and $\Pr(H_2|E)$, namely posterior probabilities.

$$\frac{\Pr(H_1)}{\Pr(H_2)} \cdot \frac{\Pr(E|H_1)}{\Pr(E|H_2)} = \frac{\Pr(H_1)}{\Pr(H_2)} \cdot LR = \frac{\Pr(H_1|E)}{\Pr(H_2|E)}. \quad (9)$$

Bayes theorem became the foundation of the empirical cross entropy (ECE) approach for assessing the LR models performance enclosing the values of LR, prior and posterior probabilities [4,9,10,37,38]. It is a method based upon the system of rewarding and penalising the obtained LR values. The LR models responses supporting the incorrect hypothesis are penalised according to logarithmic strictly proper scoring rules (Fig. 5a). The higher the support for the incorrect hypothesis, the greater penalty is assigned to the model's response, i.e. $-\log_2\Pr(H_1|E)$, when H_1 is true and $-\log_2\Pr(H_2|E)$, when H_2 is true.

The ECE as a proper measure of performance is then proposed by taking into account the mean penalties computed from N_1 and N_2 experiments performed in the aim to estimate the rates of false negative and false positive answers (under H_1 and H_2 hypotheses), which are weighted by the relevant prior probabilities $\Pr(H_1)$ and $\Pr(H_2)$:

$$ECE = \frac{\Pr(H_1)}{N_1} \sum_{i=1}^{N_1} \log_2 \left[1 + \frac{\Pr(H_2)}{LR_i \Pr(H_1)} \right] + \frac{\Pr(H_2)}{N_2} \sum_{j=1}^{N_2} \log_2 \left[1 + \frac{LR_j \Pr(H_1)}{\Pr(H_2)} \right]. \quad (10)$$

The ECE is computed for the set of possible prior probability quotients $\Pr(H_1)/\Pr(H_2)$ since assigning any particular values to the *a priori* probabilities $\Pr(H_1)$ and $\Pr(H_2)$ is not the task of the forensic expert. Therefore the ECE outcome is illustrated in the form of a diagram presenting the ECE values for a set of $\Pr(H_1)/\Pr(H_2)$ commonly referred to as *prior odds* in favour of H_1 : $\log_{10}Odds(H_1)$.

Each diagram consists of three curves, which relative location represents the LR model performance (Fig. 5b):

- (a) the solid (red) curve (named *experimental*) - represents the ECE values calculated using the LR model, which performance is under investigation (Equation (10)),
- (b) the dashed (blue) curve (named *calibrated*) - represents the ECE values obtained for the experimental LR values transformed with Pool Adjacent Violators algorithm (PAV) [4,39,40]. The discriminating power, expressed by the levels of false positive and false negative answers, of the calibrated set of LRs remains unchanged, even though it boasts the best performance (i.e. LR values strongly support the correct hypotheses and give weak support for the incorrect). Therefore, the observed differences between the *calibrated* curve and the ECE curve for the experimental LR set indicate the possibility of improving the model performance,
- (c) the dotted (black) curve (named *null*) - represents the performance of a model, which does not support any of the hypotheses ($LR = 1$). This model always produces identical curves, acting as reference curves for estimating the model performance.

The relative location of the ECE curve for the experimental set of LR values (solid, red line) to the remaining two (dashed, blue and dotted, black lines) illustrates the performance of the LR model as a way for commenting on the evidential value. If there is still too much uncertainty within the model about the correct hypothesis, the ECE curve for experimental LR values will grow, and more information will be needed in order to identify the true hypothesis. The best models for the interpretation of the evidence under analysis are those for which the ECE curve lies as low as possible and as close as possible to the *calibrated* curve. If the curve appears to have greater values than the ones in the *null* method, the evidence evaluation introduces more misleading information than when assuming evidence neutrality ($LR = 1$). For the purposes of this research, the information about the reduction of information loss due to the analysis of evidence always refers to the point of $\log_{10}Odds(H_1) = 0$ (Fig. 5), although it could also be compared for any value of the prior odds.

2.3. Software

All the calculations including the spectra pretreatment, chemometric methods application and LR calculations were performed

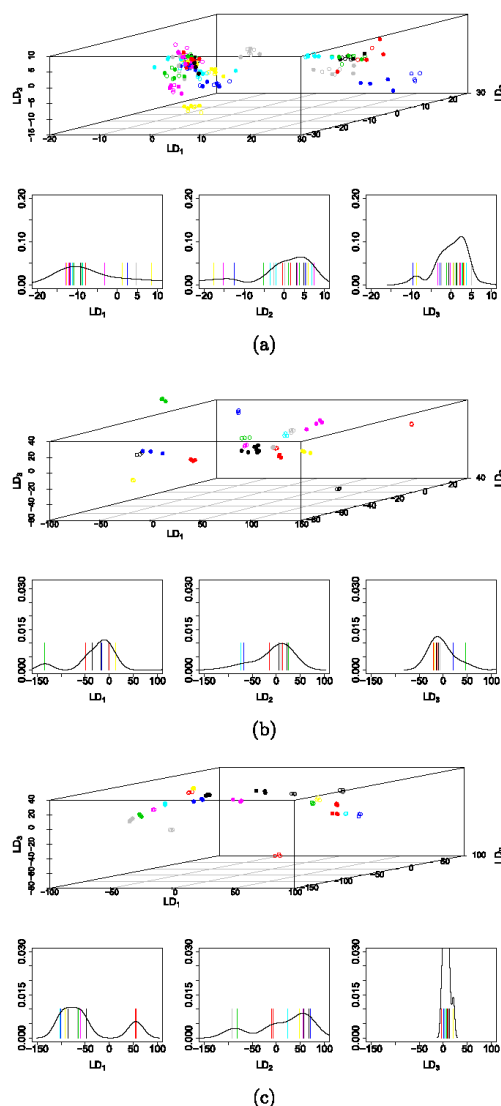


Fig. 6. (a) FTIR polypropylene, (b) Raman solid car paints, (c) Raman metallic car paints distance representation of spectra, in the space of first three linear discriminants. The plots refer to randomly selected pairs of training and test sets.

using R software [41], including the MASS [42] and mclust [43] packages implemented in the environment.

3. Results and discussion

3.1. Descriptive statistics

The assumption of normal within-sample distribution and

constant within-sample variance was made. However, it cannot be verified formally as there are only a few replicate measurements within each sample, which is not enough for any statistical test for normality.

Fig. 6 demonstrates the projections of spectra features in the distance representation on the first three linear discriminant directions. The plots in Fig. 6 refer to only a single randomly selected test set. The diagrams visualise the effect of applying LDA for maximising the between-object variability and minimising the within-object variability. This is portrayed by well separated groups of observations coming from the same samples of the training set (see same colour empty dots in Fig. 6). The projections of test data (see same colour full dots in Fig. 6) in most cases also generate clusters of points representing the spectra recorded for the same sample. However, their within-object distributions seem to be more dispersed than for training data. This finding is most likely due to the fact that the training sets are not as numerous as they should be for being representative of the whole population and in many cases may be insufficient for extensive description of the data genuine structure.

The plots in Fig. 6 outline also the underlying distribution of data for first three linear discriminant directions, which cannot be assumed to be normal. For this reason, kernel density estimation was applied for modelling the between-object distribution in a non-parametric way (see section 2.2.3).

3.2. LR models performance

In previous sections it was shown that usually only first few LDs seem to be credible variables for LR models construction, i.e. delivering $C \gg U$. They can be selected using the BIC criterium and then used for constructing univariate, bivariate, trivariate etc. *naïve* LR models. The presented results of LR calculations account only for univariate, bivariate and trivariate LR models. For the FTIR spectra database there are only univariate and bivariate LR models presented due to insufficient number of results for trivariate LR models. It appears as a consequence of the BIC criterium that usually chose only two LDs that proved useful.

The experiments for estimation of the levels of false positive and false negative answers were designed for the test sets according to the scheme described in section 2.2.4 (Fig. 4). For each comparison between two samples there were $s = 100$ LR values (being consequence of $s = 100$ random selections of test and training sets) within each LR model expressing the evidential value of their similarity. Fig. 7 illustrates the overall performance of the LR models under investigation in regard to the various distance metrics. Each violin plot, being a hybrid of a boxplot and a kernel density plot curved along the boxplot sides, corresponds to the false positive or false negative outcomes yielded from $s = 100$ test sets (Fig. 4).

The diagrams in Fig. 7 clearly demonstrate the dependency between the false positive or false negative rates observed for various LR models. Regardless of the distance metric it was noted that accounting for more LDs in *naïve* LR models leads to decreasing of the false positive rates. This is not observed for false negative rates, which rather stabilise around 5% for FTIR spectra of polypropylene and 10% for Raman spectra of car paints. As demonstrated in Fig. 7a the rates of incorrect models responses seem to be the lowest (below 20% for univariate LR models and around 10% for bivariate ones) when squared Euclidean and correlation based distance metrics were used. The outcomes for Raman spectra databases are more stable and insensitive to the chosen distance metrics and oscillate between ca. 20% for univariate LR models to less than 5% for trivariate ones. The general impression indicates that on the basis of the LR approach Raman spectra for car paints

44

A. Martyna et al. / Analytica Chimica Acta 931 (2016) 34–46

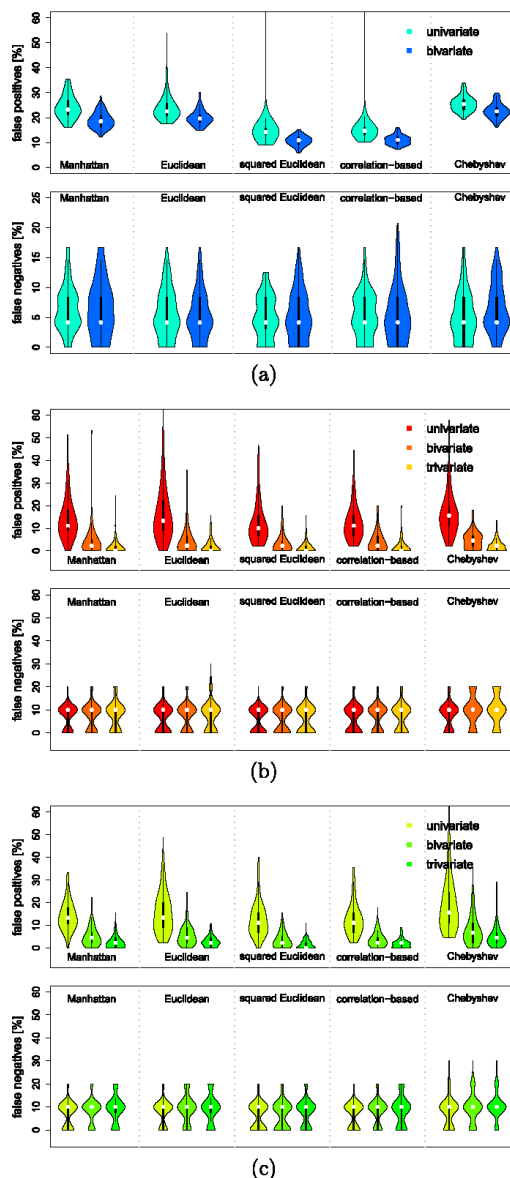


Fig. 7. Illustration of the levels of false positive and false negative answers for univariate (Equation (2)), bivariate (Equation (3)) and trivariate (Equation (4)) naïve LR models in regard to the distance metric for (a) FTIR polypropylene spectra, (b) Raman solid car paints spectra, (c) Raman metallic car paints spectra. Each violin plot accounts for all generated $s = 100$ test sets. For the FTIR spectra database there are only uni- and bivariate LR models presented due to very limited number of results for trivariate ones.

are more effectively differentiated than FTIR spectra for polymers.

The results of ECE plots accounting for the strength of the support towards both hypotheses also confirm above findings.

Table 1 demonstrates the ECE values for particular LR models ($C_{lr,exp}$, Fig. 5b) and the calibrated ECE values ($C_{lr,cal}$, Fig. 5b), both referring to $\log_{10}Odds(H_1) = 0$ (Fig. 5b). Each value corresponds to the ECE results from the median set of LR values (regarded as a kind of a representative LR set) for each comparison obtained from all $s = 100$ sets of LR values yielded for particular LR model. Table 1 clearly illustrates that the LR models for FTIR spectra are most effective when squared Euclidean or correlation-based distance metrics are used with the lowest $C_{lr,exp}$ and $C_{lr,cal}$ values. For Raman spectra databases it is much more difficult to clearly indicate any distance metric yielding the most promising results, since all of them prove that the performance of the proposed LR models is very good. Furthermore it is observed that the $C_{lr,exp}$ values decrease with the augmenting dimensionality of the LR models, indicating better performance and calibration of the LR models.

Significant differences between the experimental ($C_{lr,exp}$) and calibrated ($C_{lr,cal}$) ECE curves for FTIR spectra database (Table 1) point out great opportunities for improving the models performance. An improvement may involve expanding the database to allow better capturing of all the relevant features characteristic for the whole population of the analysed samples.

An additional merit of the proposed methodology is that, despite the very small database, the results obtained are satisfactory. Although the small size of the database necessitates caution when drawing conclusions and when making generalisations for legal processing, it is still more advantageous to apply the LR approach, even using a small database, than to perform subjective visual comparison of spectra, where the database features are completely ignored.

4. Conclusions

The presented studies were focused mainly on verifying the applicability of the LR approach for commenting on the evidential value of highly multidimensional data for polypropylene and car paints in the form of FTIR and Raman spectra. From the results already seen, chemometric tools seem to provide noteworthy solutions for effective data dimensionality reduction, which is indispensable prior to LR calculations. This combination of techniques addresses various aspects of multidimensional data analysis and provides a compact solution to the stated comparison problem of spectra. It is especially important as chemometric tools outcomes cannot be directly interpreted for forensic purposes and their application has to be followed by the LR approach. Therefore, combining the chemometric tools results with the LR approach has been gaining importance in recent years [14,15] due to the more complex data structures delivered by advanced analytical equipment.

Comprehending the results of LDA for distance representation of spectra for solving their comparison problem using LR approach enables capturing the relevant between-object variability, which is usually lost when only, for example, PCA is applied. Moreover, converting the space from feature to distance representation and using LDA leads to the most effective spectra compression by extracting only the information corresponding with characteristic objects features and neglecting the irrelevant noise or negligible variability.

From the results shown, it is evident that practically only the first few LDs will play an important role and constitute credible variables for solving the comparison problem with the application of naïve LR approach. The findings confirm that it is always a matter of finding a compromise between the LR model complexity (the number of variables it accounts for) and the magnitude of the misleading results it yields.

With the diversity of analysed microtraces growing rapidly,

Table 1

Empirical cross entropy results concerning $C_{lr,exp}$ (corresponding with experimental solid red curve in Fig. 5b at $\log_{10}Odds(H_1) = 0$) or $C_{lr,cal}$ (corresponding with calibrated dashed blue curve in Fig. 5b at $\log_{10}Odds(H_1) = 0$) yielded for the proposed LR models. For FTIR spectra database there are only univariate and bivariate LR models presented due to insufficient number of results for trivariate LR models.

	$C_{lr,exp}$ [%]	$C_{lr,cal}$ [%]	$C_{lr,exp}$ [%]	$C_{lr,cal}$ [%]	$C_{lr,exp}$ [%]	$C_{lr,cal}$ [%]
	Univariate		Bivariate		Trivariate	
FTIR polypropylene spectra						
Manhattan	41.8		38.5	26.9	—	—
Euclidean	41.7	33.7	46.0	27.2	—	—
Squared Euclidean	27.7	30.3	22.3	14.5	—	—
Correlation-based	27.8	17.7	22.7	15.3	—	—
Chebyshev	49.2	19.9	47.4	27.9	—	—
Raman spectra of solid car paints						
Manhattan	5.8	0.0	0.7	0.0	0.1	0.0
Euclidean	5.9	0.0	0.7	0.0	0.09	0.0
Squared Euclidean	4.7	0.0	0.4	0.0	0.05	0.0
Correlation-based	4.9	0.0	0.5	0.0	0.05	0.0
Chebyshev	8.4	0.0	1.4	0.0	0.3	0.0
Raman spectra of metallic car paints						
Manhattan	6.7	0.0	1.1	0.0	0.02	0.0
Euclidean	5.9	0.0	0.8	0.0	0.1	0.0
Squared Euclidean	5.6	0.0	0.6	0.0	0.1	0.0
Correlation-based	5.6	0.0	0.7	0.0	0.1	0.0
Chebyshev	7.6	0.0	1.4	0.0	0.3	0.0

researchers are often faced with limited databases due to the time and resources required for data collection. The results presented here show that the proposed methodology works even for such small databases, giving reliable conclusions in the comparison problem. Caution is needed, however, when generalizing these conclusions, as small databases may underrepresent the relevant population.

As was demonstrated in this paper, the likelihood ratio approach is capable of solving the comparison problem of highly multivariate and correlated data after proper extraction of the most relevant variance information hidden in the data structure. On the basis of the promising findings presented, work on the remaining issues is being continued and will be presented in future publications.

Acknowledgements

The experiments were undertaken within the National Science Centre in Poland (Preludium 6 no. 2013/11/N/ST4/01547) and the Institute of Forensic Research projects VI K/2013-15 and IV K/2015-17.

References

- [1] ENFSI, ENFSI Guideline for Evaluative Reporting in Forensic Science. Strengthening the Evaluation of Forensic Results across Europe, European Network of Forensic Science Institutes, 2015.
- [2] C. Aitken, F. Taroni, Statistics and the Evaluation of Evidence for Forensic Scientists, Wiley, Chichester, 2004.
- [3] C. Aitken, G. Zadora, D. Lucy, A two-level model for evidence evaluation, *J. Forensic Sci.* 52 (3) (2007) 412–419.
- [4] G. Zadora, A. Martyna, D. Ramos, C. Aitken, Statistical Analysis in Forensic Science: Evidential Value of Multivariate Physicochemical Data, Wiley, 2014.
- [5] D. Meuwly, Forensic individualisation from biometric data, *Sci. Justice* 46 (2006) 205213.
- [6] A. Hepler, C. Saunders, L. Davis, J. Buscaglia, Score-based likelihood ratios for handwriting evidence, *Forensic Sci. Int.* 219 (2012) 129140.
- [7] G. Gonzalez-Rodriguez, A. Drygajlo, D. Ramos-Castro, M. Garcia-Gomar, J. Ortega-Garcia, Robust estimation, interpretation and assessment of likelihood ratios in forensic speaker recognition, *Comput. Speech Lang.* 20 (2006) 331355.
- [8] A. Michalska, A. Martyna, J. Zieba-Palus, G. Zadora, Application of a likelihood ratio approach in solving a comparison problem of Raman spectra recorded for blue automotive paints, *J. Raman Spectrosc.* 46 (2015) 772–783.
- [9] D. Ramos, G. Zadora, Information-theoretical feature selection using data obtained by scanning electron microscopy coupled with an energy dispersive X-ray spectrometer for the classification of glass traces, *Anal. Chim. Acta* 705 (2011) 207–217.
- [10] G. Zadora, D. Ramos, Evaluation of glass samples for forensic purposes – an application of likelihood ratios and an information-theoretical approach, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 102 (2010) 63–83.
- [11] J. Zieba-Palus, G. Zadora, J. Milczarek, Differentiation and evaluation of evidence value of styrene acrylic urethane topcoat car paints analysed by pyrolysis-gas chromatography, *J. Chromatogr. A* 1179 (2008) 47–58.
- [12] R. Dahlhaus, Graphical interaction models for multivariate time series, *Metrika* 51 (2000) 157–172.
- [13] R. Allen, D. Mills, Signal Analysis. Time, Frequency, Scale and Structure, Wiley, 2004.
- [14] P. Wlasiuk, A. Martyna, G. Zadora, A likelihood ratio model for the determination of the geographical origin of olive oil, *Anal. Chim. Acta* 853 (2015) 187–199.
- [15] A. Martyna, G. Zadora, I. Stanimirova, D. Ramos, Wine authenticity verification as a forensic problem: an application of likelihood ratio test to label verification, *Food Chem.* 154 (2014) 287–295.
- [16] S. Wiklund, E. Johansson, M. Sjostrom, E. Mellerowicz, U. Edlund, J. Shockcor, et al., Visualization of GC/TOF-MS-based metabolomics data for identification of biochemically interesting compounds using opls class models, *Anal. Chem.* 80 (2008) 115–122.
- [17] J. Ahlinder, A. Nordgaard, S. Lindström, Chemometrics comes to court: evidence evaluation of chem-bio threat agent attacks, *J. Chemom.* 29 (2015) 267276.
- [18] A. Bolck, H. Ni, M. Lopatka, Evaluating score- and feature-based likelihood ratio models for multivariate continuous data: applied to forensic MDMA comparison, *Law, Probab. Risk* 14 (2015) 243–266.
- [19] C. Muehlethaler, G. Massonnet, P. Esseiva, The application of chemometrics on infrared and Raman spectra as a tool for the forensic analysis of paints, *Forensic Sci. Int.* 209 (2011) 173–182.
- [20] C. Muehlethaler, G. Massonnet, P. Esseiva, Discrimination and classification of FTIR spectra of red, blue and green spray paints using a multivariate statistical approach, *Forensic Sci. Int.* 244 (2014) 170–178.
- [21] A. Martyna, A. Michalska, G. Zadora, Interpretation of FTIR spectra of polymers and Raman spectra of car paints by means of likelihood ratio approach supported by wavelet transform for reducing data dimensionality, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 3357–3376.
- [22] I. Daubechies, Ten Lectures on Wavelets, CBMS-NSF Regional Conference Series in Applied Mathematics, Philadelphia, 1992.
- [23] B. Walczak (Ed.), Wavelets in Chemistry, Elsevier, 2000.
- [24] B. Alsberg, A. Woodward, D. Kell, An introduction to wavelet transforms for chemometricians: a time-frequency approach, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 37 (1997) 215–239.
- [25] R. Tautler, B. Walczak, S. Brown, Comprehensive Chemometrics, Elsevier, 2009.
- [26] E.M. Hazewinkel, Y. Subbotin, Encyclopedia of Mathematics, Springer, 2001.
- [27] E. Wee, D. Grayden, Y. Zhu, K. Petkovic-Duran, D. Smith, A continuous wavelet transform algorithm for peak detection, *Electrophoresis* 29 (2008) 4215–4225.
- [28] P. Zierzucha, B. Walczak, Concept of (dis)similarity in data analysis, *Trends Anal. Chem.* 38 (2012) 116–128.
- [29] D. Porro, R. Duin, I. Talavera, N. Hernandez, Alternative representations of spectral data for classification, in: Proc. ASCI 2009, 15th Annual Conf of the Advanced School for Computing and Imaging (Zeeuwlde, June 3-5, 2009), 2009.
- [30] D. Porro-Munoz, I. Talavera, R. Duin, N. Hernandez, M. Orozco-Alzate, Dissimilarity representation on functional spectral data for classification,

- J. Chemom. 25 (2011) 476486.
- [31] J. Bouveyron, Probabilistic model-based discriminant analysis and clustering methods in chemometrics, *J. Chemom.* 27 (2013) 433–446.
- [32] K. Varmuza, P. Filzmoser, *Introduction to Multivariate Statistical Analysis in Chemometrics*, Wiley, 2009.
- [33] A. Raftery, N. Dean, Variable selection for model-based clustering, *J. Am. Stat. Assoc.* 101 (2006) 168–178.
- [34] T. Murphy, A. Raftery, N. Dean, Variable selection and updating in model-based discriminant analysis for high dimensional data with food authenticity applications, *Ann. Appl. Stat.* 6 (2012) 396–421.
- [35] B. Silverman, *Density Estimation for Statistics and Data Analysis*, Chapman and Hall, London, UK, 1986.
- [36] C. Aitken, D. Lucy, Evaluation of trace evidence in the form of multivariate data, *Appl. Stat.* 53 (2004) 109–122.
- [37] N. Brümmer, J. du Preez, Application independent evaluation of speaker detection, *Comput. Speech Lang.* 20 (2006) 230–275.
- [38] D. Ramos, J. Gonzalez-Rodriguez, G. Zadora, C. Aitken, Information-theoretical assessment of the performance of likelihood ratio computation methods, *J. Forensic Sci.* 58 (2013) 1503–1518.
- [39] M. Ayer, H. Brunk, G. Ewing, W. Reid, E. Silverman, An empirical distribution function for sampling with incomplete information, *Ann. Math. Stat.* 26 (1955) 641–647.
- [40] M. Best, N. Chakravarti, Active set algorithms for isotonic regression; a unifying framework, *Math Program* 47 (1990) 425–439.
- [41] R. Core Team, *R: a Language and Environment for Statistical Computing*, R Foundation for Statistical Computing, 2012. Vienna, Austria, <http://www.R-project.org/>. ISBN 3-900051-07-0.
- [42] B. Ripley, B. Venables, D. Bates, K. Hornik, A. Gebhardt, D. Firth, Package MASS, 2015. <https://cran.r-project.org/web/packages/MASS/MASS.pdf>.
- [43] C. Fraley, A. Raftery, L. Scrucca, T. Murphy, M. Fop, Package mclust, 2015. <https://cran.r-project.org/web/packages/mclust/mclust.pdf>.

Kraków, dnia 28 sierpnia 2017 r.

Oświadczenie

Oświadczam, iż w publikacji *Hybrid approach combining chemometrics and likelihood ratio framework for reporting the evidential value of spectra* opublikowanej w *Analytica Chimica Acta*, 931 (2016) 34-46 mój udział polegał na:

- współpracy w formułowaniu hipotezy badawczej,
- przeprowadzeniu analiz materiałów polimerowych z wykorzystaniem spektrometrii w podczerwieni,
- zaproponowaniu hybrydowych modeli łączących metody chemometryczne z modelami ilorazu wiarygodności oraz przeprowadzeniu stosownych obliczeń,
- współpracy w ocenie i interpretacji wyników,
- tworzeniu publikacji i formułowaniu odpowiedzi na recenzje.

dr Agnieszka Martyna

Zakład Chemii Analitycznej
Instytut Chemii
Uniwersytet Śląski w Katowicach
ul. Szkolna 9, 40-003 Katowice

Glasgow, 9th May 2017

To whom it may concern

Hereby,

I declare that my overall contribution to the article *Hybrid approach combining chemometrics and likelihood ratio framework for reporting the evidential value of spectra* published in *Analytica Chimica Acta*, 931 (2016) 34-46 mostly concerned

- discussion on the applied chemometric and statistical tools,
- providing comments on the manuscript,
- language support,
- assistance in preparing the answers to the reviewers.



Dr Tereza Neocleous

School of Mathematics and Statistics

Mathematics and Statistics Building

University of Glasgow

University Place

Glasgow G12 8SQ, United Kingdom

INSTYTUT EKSPERTYZ SĄDOWYCH

im. Prof. dra Jana Sehna

PL 31-033 Kraków, ul. Westerplatte 9
tel. (+48 12) 61 85 700, fax (+48 12) 422 38 50
e-mail: ies@ies.krakow.pl

Kraków, dnia 25 sierpnia 2017 r.

Oświadczenie

Oświadczam, iż w publikacji *Hybrid approach combining chemometrics and likelihood ratio framework for reporting the evidential value of spectra* opublikowanej w *Analytica Chimica Acta*, 931 (2016) 34-46 mój udział polegał na:

- współpracy w formułowaniu hipotezy badawczej,
- ustaleniu ogólnej koncepcji badań oraz etapów postępowania,
- współpracy w ocenie i interpretacji wyników,
- pomocy przy tworzeniu publikacji, w przeprowadzeniu procesu redakcyjnego i formułowaniu odpowiedzi na recenzje.



dr hab. Grzegorz Zadora, prof. IES

Instytut Ekspertyz Sądowych
im. Prof. dra Jana Sehna w Krakowie
ul. Westerplatte 9, 31-033 Kraków

Zakład Chemii Analitycznej
Instytut Chemii
Uniwersytet Śląski w Katowicach
ul. Szkolna 9, 40-003 Katowice

Glasgow, 9th May 2017

To whom it may concern

Hereby,

I declare that my overall contribution to the article *Hybrid approach combining chemometrics and likelihood ratio framework for reporting the evidential value of spectra* published in *Analytica Chimica Acta*, 931 (2016) 34-46 mostly concerned

- discussion on the applied chemometric and statistical tools,
- providing comments on the manuscript,
- language support,
- assistance in preparing the answers to the reviewers.



Dr Nema Dean

School of Mathematics and Statistics

Mathematics and Statistics Building

University of Glasgow

University Place

Glasgow G12 8SQ, United Kingdom

INSTYTUT EKSPERTYZ SĄDOWYCH

im. Prof. dra Jana Sehna

PL 31-033 Kraków, ul. Westerplatte 9
tel. (+48 12) 61 85 700, fax (+48 12) 422 38 50
e-mail: ies@ies.krakow.pl

Kraków, dnia 23 sierpnia 2017 r.

Oświadczenie

Oświadczam, iż w publikacji *Hybrid approach combining chemometrics and likelihood ratio framework for reporting the evidential value of spectra* opublikowanej w *Analytica Chimica Acta*, 931 (2016) 34-46 mój udział polegał na:

- przeprowadzeniu analiz lakierów samochodowych z wykorzystaniem spektrometrii ramanowskiej,
- weryfikacji efektywności zaproponowanej metodologii interpretacji wyników,
- współpracy w interpretacji wyników odnoszących się do widm Ramana,
- pomocy w tworzeniu publikacji i formułowaniu odpowiedzi na recenzje.

Aleksandra Michalska

Instytut Ekspertyz Sądowych
im. Prof. dra Jana Sehna w Krakowie
ul. Westerplatte 9, 31-033 Kraków

Publikacja 6

Tytuł:	Investigation of various factors influencing Raman spectra interpretation with the use of likelihood ratio approach.
Autorzy:	Michalska A. , Martyna A., Zadora G.
Czasopismo:	<i>Forensic Science International</i>
Wartość <i>Impact Factor</i> :	1,989
Punkty MNiSW:	40
Cytowana w rozprawie jako:	Michalska i in. 2017



Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/forensiint

Investigation of various factors influencing Raman spectra interpretation with the use of likelihood ratio approach

Aleksandra Michalska^{a,*}, Agnieszka Martyna^b, Grzegorz Zadara^{a,b}^a Institute of Forensic Research, Westerplatte 9, 31-033 Krakow, Poland^b Department of Analytical Chemistry, Institute of Chemistry, The University of Silesia, Szkolna 9, 40-006 Katowice, Poland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 July 2017

Received in revised form 24 October 2017

Accepted 26 October 2017

Available online 3 November 2017

Keywords:

Blue automotive paints

Comparison problem of Raman spectra

Likelihood ratio test

Photobleaching pre-treatment

Spectra variability assessment

ABSTRACT

The main aim of this study was to verify whether selected analytical parameters may affect solving the comparison problem of Raman spectra with the use of the likelihood ratio (LR) approach. Firstly the LR methodologies developed for Raman spectra of blue automotive paints obtained with the use of 785 nm laser source (results published by the authors previously) were implemented for good quality spectra recorded for these paints with the use of 514.5 nm laser source. For LR models construction two types of variables were used i.e. areas under selected pigments bands and coefficients derived from discrete wavelet transform procedure (DWT).

Few experiments were designed for 785 nm and 514.5 nm Raman spectra databases after constructing well performing LR models (low rates of false positive and false negative answers and acceptable results of empirical cross entropy approach).

In order to verify whether objective magnification described by its numerical aperture affects spectra interpretation, three objective magnifications $20\times$ (N.A. = 0.4), $50\times$ (N.A. = 0.75) and $100\times$ (N.A. = 0.85) within each of the applied laser sources (514.5 nm and 785 nm) were tested for a group of blue solid and metallic automotive paints having the same sets of pigments depending on the applied laser source. The findings obtained by two types of LR models indicate the importance of this parameter for solving the comparison problem of both solid and metallic automotive paints regardless of the laser source used for measuring Raman signal. Hence, the same objective magnification, preferably $50\times$ (established based on the analysis of within- and between-samples variability and F-factor value), should be used when focusing the laser on samples during Raman measurements.

Then the influence of parameters (laser power and time of irradiation) of one of the recommended fluorescence suppression techniques, namely photobleaching, was under investigation. Analysis performed on a group of solid automotive paint samples showed that time of irradiation upon established laser power does not affect solving the comparison problem with the use of LR test. Likewise upon established time of irradiation 5% or 10% laser power could be used interchangeably without changing conclusions within this problem. However, upon the established time of irradiation changes in laser power between control and recovered sample from 5% or 10% to 50% may cause erroneous conclusions. Additionally it was also proved that prolonged irradiation of paint does not quantitatively affect pigments bands areas revealed after such a pre-treatment.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

One of the most important tasks forensic experts face is a comparison problem based on confirmation or exclusion that two

samples, one found on a scene of crime (so-called recovered sample) and one delivered as a control material, stem from the same object [1]. In case of comparative analysis of automotive paints various analytical techniques are implemented including microscopy [2,3], microspectrophotometry [4,5], elemental analysis with the use of scanning electron microscopy-energy dispersive X-ray analysis or X-ray fluorescence [2] as well as infrared spectroscopy [4,6], Raman spectroscopy [7,8] and pyrolysis gas chromatography mass spectrometry [9]. From the above mentioned techniques Raman spectroscopy is usually used for

* Corresponding author.

E-mail addresses: amichalska@ies.krakow.pl (A. Michalska), agnieszka.martyna@chemia.us.edu.pl (A. Martyna), gzadara@ies.krakow.pl (G. Zadara).

<https://doi.org/10.1016/j.forensiint.2017.10.034>
0379-0738/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

determining pigments composition responsible for colour and shade of the compared paints.

Typically comparison problem of paints based on their Raman spectra is solved in the visual way [6,8,10,11] by overlaying spectra obtained for the recovered and control samples and detecting the similarities and discrepancies between them. The method seems to be sufficient only when compared spectra are totally different which means they exhibit different sets of pigments or diverge at least in the presence of one intensive band. Then making a decision that both paints have different origins is straightforward. The problem arises when compared spectra differ only in a single non intensive band. Then visual examination does not allow to objectively decide whether small changes observed in the compared spectra are the effect of samples inhomogeneity, possible contamination or degradation of one of the samples or arise from the methodology which was applied for paints recovery [1,12] or point out different origins of samples. What is more even in case of full conformity of spectra there is lack of reliable estimation whether observed similarities result from common origin of the samples or may be observed by chance. It should be born in mind that automotive paints are mass product and their pigment composition is not their unique feature. As a consequence, information about a rarity of the analysed attribute (e.g. pigment composition determining specific colour of automotive paint) should always be taken into account. The method which allows to include information about the rarity as well as objectively decide whether compared samples share common origin is likelihood ratio (LR) approach.

This method is based on interpretation of obtained data (here: Raman spectra) in the context of two contrasting hypotheses, i.e.: H_1 mostly associated with prosecutor, who states that compared samples stem from the same object, and alternative hypothesis, H_2 , which describes defence statement about different origins of the samples. In practice this methodology is based upon establishing the conditional probabilities— $\Pr(E|H_1)$ and $\Pr(E|H_2)$, and evaluation of the likelihood ratio value expressed by equation:

$$LR = \frac{\Pr(E|H_1)}{\Pr(E|H_2)}$$

The likelihood ratio approach allows not only for objective evaluation which hypothesis is more credible based on the evidence (here E similarity of the compared spectra) but, in contrary to visual examination, gives also the information about the strength of support for particular hypothesis, which is crucial from forensic perspective. The only inconvenience is obtaining a value equal to the threshold value which is given at one and provides indecisive conclusion (both of tested hypotheses are equally supported). In other cases LR results are interpreted as follows: LR value greater than unity indicates that evidence (E) supports prosecutor's hypothesis (H_1), while value below unity supports defence's hypothesis (H_2). Generally, the higher the value of the likelihood ratio, the stronger the support for the prosecution proposition is (H_1). Likewise, the lower the value of the likelihood ratio, the stronger the support for the defence proposition is (H_2). Apart from objective estimation of the similarity of the compared samples and information about the rarity of the determined physicochemical characteristics in the relevant population incontestable advantage of LR approach is taking into consideration possible sources of uncertainty like within-object variability related to e.g. inhomogeneity of the analysed sample as well as between-object variability, which takes into account the information about variation of measurements of characteristics between various samples in the relevant population. All mentioned factors pose significant elements which should always be considered during the evaluation process.

However, most of them is partially ignored by other statistical tests like t-test or chemometric approaches like Principal Component Analysis. All these advantages make the likelihood ratio approach recommended and well accepted measure of evidence value in the forensic sphere [1,8,13–27].

Despite its merits, LR methodology was not applied for solving the comparison problem of samples based on their Raman spectra before 2015 [23]. The reason for that relates to the fact that LR models are easily developed and constructed for data comprising of limited number of variables in comparison to the number of samples they describe. Handling datasets, such as spectral databases, containing only limited number of samples described by thousands of variables may pose serious difficulties in reliable estimation of LR models parameters like means, variances and co-variances. So for such multidimensional data like Raman spectra it is hard to imagine that any analyst will spend plenty of time analysing thousands of samples in order to reliably estimate models parameters. As a consequence the only reasonable solution seems to be smart depletion of the number of variables without losing significant information about the samples and then using these new variables in LR calculations.

Till now, authors have proposed three various approaches for reducing the dimensionality of Raman spectra recorded for blue automotive paints. In the first one each spectrum was described by new set of variables being areas under the selected pigment bands [23]. In the remaining two chemometric tools including discrete wavelet transform [20] or distance representation coupled with linear discriminant analysis [21] were applied. New sets of variables selected upon each procedure were further used for LR models construction. It was proved that either of the data dimensionality reduction methodologies LR approach enabled for solving the comparison problem of paints based on their Raman spectra. Apart from making the evaluation process more objective, it was also stated, that the levels of false positive answers (when results indicate that compared samples stem from the same object while in fact they originate from different sources) delivered by these models were definitely lower or at least comparable with those yielded during visual spectra comparison performed on the same group of samples [23]. In contrary to visual examination, in LR models the information about inhomogeneity of paint samples expressed by the level of false negative rates (when results indicate that compared samples stem from different objects while in fact they originate from the same source) could be included.

Till now the comparison problem of blue automotive paints based on Raman data and evaluated with the use of LR approach pertained only to good quality spectra obtained with the use of near infrared semiconductor laser at 785 nm. When the same paints were analysed using argon ion laser (514.5 nm) as an excitation source most of them exhibited only fluorescence in their spectra. To deal with such an inconvenience one of the recommended fluorescence suppression techniques [28,29] namely photobleaching pre-treatment was applied. The procedure was based on constant sample irradiation for a long period of time before acquiring the spectrum. The source of light was simply the Raman spectrometer's laser with the same line as that used for sample excitation. The employed methodology allowed to quench fluorescence background in 18 out of 20 paint samples revealing previously masked weaker Raman signal. Moreover, the results indicated that the process of quenching fluorescence is repeatable and durable and, what was crucial, the position and shape of pigments bands revealed after such a pre-treatment was not visually affected [30]. Therefore the question arises: could Raman spectra obtained after photobleaching process be used in solving the comparison problem with the use of LR approach? And

whether Raman spectra recorded for particular paint after such a pre-treatment have the same evidential value regardless of parameters used during this process. Therefore, one of the aims of the presented research was to check whether photobleaching factors such as laser power or time of irradiation affect inferencing within the comparison problem solved with the use of LR test. Additionally authors verified also whether prolonged irradiation of paint samples during photobleaching process causes quantitative changes in Raman spectra. This evaluation was imposed by other research [31,32] which points out such an inconvenience.

Numerical aperture (N.A.) of objective used for focusing on the sample during Raman measurements was another factor under investigation. Numerical aperture describes objective magnification and determines the area of laser interaction with the sample (so-called laser spot size — d_{xy}) according to the twice Rayleigh criteria $d_{xy} = \frac{1.22\lambda}{NA}$ (where λ is a laser wavelength) as well as affects the depth of penetration of the laser (so-called depth of field — d_z) according to the equation $d_z = \frac{4n\lambda}{(NA)^2}$ (where n is the refractive index of specimen). As a consequence, this parameter can have an important impact on solving the comparison problem of spectra due to the fact that it may affect both within-object variability, growing with inhomogeneity of the automotive paints samples, as well as the measurements repeatability. Although some study concerning the influence of objective magnification was actually carried out [33,34], neither of them focused on the same group of samples i.e. paints having the same colour induced by the same sets of pigments. Lambert analysed two samples having different colours i.e. one red and one green, which additionally did not contain varnish and metallic particles. Ferreira's group [33] analyzed 36 automotive paints having different colors but the influence of objective magnification was presented based on spectra recorded only for one white automotive paint. What is more in both papers [33,34] this parameter was tested [34] or presented [33] only for spectra in which Raman signal was obtained using 785 nm laser wavelength as an excitation source. In contrary to the above mentioned research, in this paper the authors focused not only on solid but also on metallic automotive paints having the same colour induced by the same sets of pigments. The influence of objective magnification described by its numerical aperture on the within- and between-sample variability was tested depending on the laser source (514.5 nm or 785 nm) used for recording Raman signal. Moreover, authors verified also whether objective magnification affects solving the comparison problem with the use of LR test, which was not investigated previously.

This article closes the series of publications [8,20,21,23,30] dedicated for forensic analysis of automotive paints with the use of Raman spectroscopy filling the gap concerning various factors which could influence solving the comparison problem of spectra.

2. Materials and methods

2.1. Raman measurements

Raman spectra were recorded using Renishaw in Via spectrometer equipped with Leica microscope and two types of excitation source — argon ion laser with excitation line at 514.5 nm and near infrared semiconductor laser at 785 nm. For 514.5 nm laser source the light was dispersed by a diffraction grating with 2400 grooves/mm, while for 785 nm the diffraction grating with 1200 grooves/mm was used. The laser applied while recording Raman spectra used 1% or 5% of its maximum power at the sample (15.5 mW) for 514.5 nm and 0.5% or 1% (maximum power at a sample 68 mW) for 785 nm. The signal was recorded using a

Peltier-cooled charge-coupled device (CCD). Spectral data were processed with Renishaw Wire 3.2 software. Spectra of all paints were recorded in situ, in the range of 200–2500 cm^{-1} , which covered the entire region where bands associated with pigments could occur. Measurements were performed using 10 s of acquisition time and collection of five accumulations. Each paint was measured at least three times. For creation of a database as well as evaluation of the influence of photobleaching parameters the laser beam was focused on samples through $50\times$ (N.A. = 0.75) objective lens, which is the magnification most frequently used in the forensic measurements and gives a theoretical spot size of approximately 2 μm . For experiments where the influence of objective magnification was tested, three different objective magnifications were applied i.e. $20\times$ (N.A. = 0.4), $50\times$ (N.A. = 0.75) and $100\times$ (N.A. = 0.85).

2.2. Likelihood ratio test for solving the comparison problem—general idea

LR models which were used for solving the comparison problem were based on the following ideas, which details may be found in Refs. [1,13,14]. In order to reliably estimate the within- and between-object variability as well as the rarity of the observed features in general population, an appropriate database comprising of m automotive paints described by p variables recorded during n_i measurements were used. Each of measurements was expressed as $\mathbf{x}_{ij} = (\mathbf{x}_{ij1}, \dots, \mathbf{x}_{ijp})^T$; $i = 1, \dots, m$; $j = 1, \dots, n_i$.

Moreover, for each of the compared samples i.e. evidence and control one, series of measurements were performed (n_1 and n_2 , respectively), and then two mean vectors ($\bar{\mathbf{y}}_1$ and $\bar{\mathbf{y}}_2$) describing these samples were calculated according to the equation $\bar{\mathbf{y}}_l = \frac{1}{n_l} \sum_{j=1}^{n_l} \mathbf{y}_{lj}$ for $l=1,2$. Further the weighted mean $\bar{\mathbf{y}}^* = \frac{n_1\bar{\mathbf{y}}_1 + n_2\bar{\mathbf{y}}_2}{n_1 + n_2}$ was computed.

The prosecution proposition, H_1 , states that the control and recovered samples described by their means, $\bar{\mathbf{y}}_1$ and $\bar{\mathbf{y}}_2$, respectively, come from the same object, while the defense proposition, H_2 , states that they come from different objects. The likelihood ratio in case of continuous type data to which Raman spectra belong is expressed as follows:

$$LR = \frac{f(\bar{\mathbf{y}}_1, \bar{\mathbf{y}}_2 | H_1, \mathbf{U}, \mathbf{C})}{f(\bar{\mathbf{y}}_1, \bar{\mathbf{y}}_2 | H_2, \mathbf{U}, \mathbf{C})},$$

where $f(\cdot)$ is the joint density function of the two means.

Two sources of uncertainty: within-object variability (\mathbf{U}) and between-object variability (\mathbf{C}) were established according to formulas given in Refs. [20,23]. Due to the fact that the number of replicates (spectra measured for each automotive paint) was low, within-object distribution was assumed normal. This assumption does not hold for the between-object distribution, therefore, a nonparametric approach, i.e. a kernel density estimation (KDE) using Gaussian kernels was adopted.

The numerator of LR expression may be given as:

$$\begin{aligned} f(\bar{\mathbf{y}}_1, \bar{\mathbf{y}}_2 | \mathbf{U}, \mathbf{C}, \bar{\mathbf{x}}, H_1) &= f(\bar{\mathbf{y}}_1 - \bar{\mathbf{y}}_2 | \mathbf{U}, H_1) \times \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m K(\bar{\mathbf{y}}^* - \bar{\mathbf{x}}_i | \mathbf{U}, \mathbf{C}, H_1) \\ &= (2\pi)^{-\frac{p}{2}} \left| \frac{\mathbf{U}}{n_1} + \frac{\mathbf{U}}{n_2} \right|^{-\frac{1}{2}} \exp \left\{ -\frac{1}{2} (\bar{\mathbf{y}}_1 - \bar{\mathbf{y}}_2)^T \left(\frac{\mathbf{U}}{n_1} + \frac{\mathbf{U}}{n_2} \right)^{-1} (\bar{\mathbf{y}}_1 - \bar{\mathbf{y}}_2) \right\} \\ &\quad \times (2\pi)^{-\frac{p}{2}} \left| \frac{\mathbf{U}}{n_1 + n_2} + h^2 \mathbf{C} \right|^{-\frac{1}{2}} \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m \\ &\quad \exp \left\{ -\frac{1}{2} (\bar{\mathbf{y}}^* - \bar{\mathbf{x}}_i)^T \left(\frac{\mathbf{U}}{n_1 + n_2} + h^2 \mathbf{C} \right)^{-1} (\bar{\mathbf{y}}^* - \bar{\mathbf{x}}_i) \right\}. \end{aligned}$$

The denominator of LR expression reads as follows:

$$\begin{aligned} f(\bar{\mathbf{Y}}_1, \bar{\mathbf{Y}}_2 | \mathbf{U}, \mathbf{C}, \bar{\mathbf{X}}, H_2) &= \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m f(\bar{\mathbf{Y}}_1 | \bar{\mathbf{X}}_i, \mathbf{U}, \mathbf{C}, H_2) \times \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m f(\bar{\mathbf{Y}}_2 | \bar{\mathbf{X}}_i, \mathbf{U}, \mathbf{C}, H_2) \\ &= (2\pi)^{-\frac{1}{2}} \left| \frac{\mathbf{U}}{n_1} + h^2 \mathbf{C} \right|^{-\frac{1}{2}} \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m \exp \left\{ -\frac{1}{2} (\bar{\mathbf{Y}}_1 - \bar{\mathbf{X}}_i)^T \left(\frac{\mathbf{U}}{n_1} + h^2 \mathbf{C} \right)^{-1} (\bar{\mathbf{Y}}_1 - \bar{\mathbf{X}}_i) \right\} \\ &\quad \times (2\pi)^{-\frac{1}{2}} \left| \frac{\mathbf{U}}{n_2} + h^2 \mathbf{C} \right|^{-\frac{1}{2}} \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m \exp \left\{ -\frac{1}{2} (\bar{\mathbf{Y}}_2 - \bar{\mathbf{X}}_i)^T \left(\frac{\mathbf{U}}{n_2} + h^2 \mathbf{C} \right)^{-1} (\bar{\mathbf{Y}}_2 - \bar{\mathbf{X}}_i) \right\}. \end{aligned}$$

When univariate data is considered, matrices and vectors are replaced with scalars.

2.3. Development of LR models for testing factors influencing Raman spectra interpretation

2.3.1. Raman spectra database

Data were collected in four databases, i.e. separately for solid and metallic automotive paints and the laser sources (514.5 nm and 785 nm) used for recording Raman signal (Experiment 1 or 2 or 3, respectively in Tables S1 and S2 Supporting information). In each database only a good quality spectra with bands originating from pigments clearly visible above background were included. As a consequence, database of solid paints (514.5 nm laser source) consisted of 18 samples whereas that built for 785 nm included 25 or 30 samples depending on the type of technique used for data dimensionality reduction. In case of metallic automotive paints and 514.5 nm laser source database comprised of 17 samples while that built for 785 nm included 30 paint samples irrespective of data dimensionality reduction technique. Each database was used for constructing LR models as well as for evaluation of the performance of the applied methodology for solving the comparison problem for samples from the database, thus without studying the influence of the tested factors (photobleaching parameters and objective magnification).

2.3.2. Spectra pre-treatment

As it was already mentioned in the previous articles [20,21,23] Raman spectra recorded for paints in different days demonstrated changeable starting and ending points and varying step between subsequent wavenumbers for which Raman signal intensity was measured. Such an inconvenience precludes describing all samples represented by their Raman spectra by the same set of variables. Therefore for dealing with this problem two methods of spectra reconstruction (linear and spline interpolation) were worked out [23]. It was proved that [20,23] all developed LR models were resistant to the way the spectra were reconstructed. Therefore herein for obtaining equally spaced data only linear interpolation was applied. New reconstructed spectra contain 1024 data points sampled every 2.053 cm^{-1} which covered the range of $200\text{--}2300 \text{ cm}^{-1}$, where all bands associated with pigments occur. Then for dealing with the fluorescence effect which caused the lift of background, continuous wavelet transform (CWT) was used. It enabled for preserving the true high-frequency Raman signal and separated it from low-frequency fluorescence. The baseline drift of each individual spectrum was removed using the Mexican hat wavelet [35] with the same set of CWT parameters for each spectrum. Finally the spectra were normalised so that the highest peak in each spectrum had an intensity of 100 (for spectra described by variables being areas under the selected band) or using Standard Normal Variate (SNV) method (for spectra described by variables selected using wavelet transform procedure).

2.3.3. Data dimensionality reduction

Two from three previously worked out methodologies [20,21,23] were used for data dimensionality reduction.

2.3.3.1. "Band area" variables. Within this approach characteristic pigments bands which seem to have significant importance in spectra differentiation were identified and then new variables were established as the areas under each of the selected bands. Table 1 illustrates the selected bands type and the range of wavenumbers they refer to for the database collected using 514.5 nm laser. These ranges border the computed areas of the bands. For 785 nm laser this information can be found in Ref. [23].

2.3.3.2. Discrete wavelet transform procedure. Due to the fact that visual determination of peak's boundaries seems to be quite subjective and sometimes may cause troubles, discrete wavelet transform procedure was applied as a second more objective data dimensionality reduction technique. During this approach for spectra compression the least asymmetric Daubechies wavelet number 5 was used as a mother wavelet [35]. Decomposition was performed to the third level and hard threshold for details coefficients at the first level of compression was used [20]. Then obtained coefficients were sorted with decreasing variance and further only these which cumulative variance was greater than 99% of total variance were used. These sets of coefficients were established from 1000 randomly created subsets of the spectra database. Further reduction of the number of coefficients results from LR models requirements for which between-sample variability (C) should be greater than within-sample variability (U). Therefore the variables were limited to only these variables/coefficients for which the ratio of C to U was greater than 100 for Raman spectra obtained using 785 nm laser and greater than 10 for Raman spectra recorded using 514.5 nm laser. This discrepancy resulted from less types of pigments identified for spectra collected using 514.5 nm laser than using 785 nm laser, which lead to the greater similarity between spectra in the first group. Finally only these coefficients which keep chemical information about the pigments in the analysed paints were taken into account. The list of coefficients selected upon this procedure for 514.5 nm Raman spectra databases is presented in Table 2 while for 785 nm Raman spectra databases this information can be found in Ref. [20].

2.3.4. Likelihood ratio calculation

2.3.4.1. Models construction. Firstly, from the selected variables the univariate LR models were proposed in order to decide whether single variable (the area under selected pigment band or the coefficients derived from DWT procedure) may be helpful in solving the comparison problem of spectra.

Apart from simple univariate models also the multivariate ones were tested. Their construction was based on the following ideas:

- if possible, only the variables delivering relatively low levels of false positive and false negative LR models responses in their univariate models were considered in multivariate ones,
- variables corresponding to different pigment bands were combined into multivariate LR models in such a way that they embrace as much varied information as possible,
- highly correlated variables formed cliques for LR computation, while these low correlated with others were treated separately (so-called *naïve* approach). The final LR values for each comparison were computed as the product of the LR models results for the selected cliques.

2.3.4.2. Validation procedure. A number of experiments were undertaken in order to evaluate the performance of the proposed LR models. Validation procedure involved both the level of false positive and false negative model responses (qualitative

Table 1

False positive (FP), false negative (FN) answers and the empirical cross entropy values ($C_{lr,exp}$ and $C_{lr,cal}$) of univariate and multivariate LR models proposed for variables being areas under selected pigment bands for solid and metallic automotive Raman spectra (514.5 nm) databases.

LR models	Spectral range of variable [cm^{-1}]	FP [%]	FN [%]	$C_{lr,exp}$ [%]	$C_{lr,cal}$ [%]
Raman spectra of solid automotive paints					
Univariate LR models					
PW6_PV23_1	380–500	31.4	5.6	160.7	53.2
PW6_PV23_PB15_2	550–660	17.6	11.1	53.0	39.9
PW6_PV23_PB15_3	570–600	22.9	5.6	62.9	45.7
PW6_PV23_4	612–635	44.4	5.6	260.3	64.5
PV23_PB15_5	660–710	22.2	11.1	54.9	42.0
PV23_PB15_6	1320–1368	30.7	11.1	81.3	56.0
PV23_7	1368–1412	42.5	5.6	87.6	57.7
PV23_PB15_8	1412–1439	35.9	0.0	69.1	47.5
PV23_PB15_9	1412–1462	19.0	11.1	63.0	43.8
PB15_10	1515–1550	21.6	5.6	77.7	41.0
Multivariate LR models					
(PW6_PV23_PB15_2, PB15_10)	550–660, 1515–1550	6.5	11.1	78.3	22.4
(PV23_7, PB15_10)	1368–1412, 1515–1550	9.0	11.1	58.3	22.1
Raman spectra of metallic automotive paints					
Univariate LR models					
PV23_1	600–635	45.6	11.8	100.0	70.1
PV23_PB15_2	550–660	41.9	17.6	82.9	68.2
PV23_PB15_3	570–600	41.9	11.8	118.5	71.4
PV23_4	612–635	51.5	11.8	139.6	76.6
PV23_PB15_5	660–710	30.1	11.8	59.9	51.6
PV23_PB15_PB60_6	1320–1368	31.6	11.8	66.8	55.1
PV23_PB60_7	1368–1412	75.7	0.0	104.8	81.9
PV23_PB15_8	1412–1439	67.6	11.8	104.7	80.5
PV23_PB15_9	1412–1462	58.8	0.0	80.2	65.5
PB15_10	1515–1550	14.0	11.8	39.3	30.1
Multivariate LR models					
(PV23_PB15_2, PB15_10)	550–660, 1515–1550	11.0	17.6	34.5	21.2
(PV23_PB60_7, PB15_10)	1368–1412, 1515–1550	14.0	11.8	38.5	22.1

Table 2

False positive (FP), false negative (FN) answers and the empirical cross entropy values ($C_{lr,exp}$ and $C_{lr,cal}$) of univariate and multivariate LR models proposed for variables selected using the discrete wavelet procedure for solid and metallic automotive Raman spectra (514.5 nm) databases.

LR models	Spectral range of variable [cm^{-1}]	FP [%]	FN [%]	$C_{lr,exp}$ [%]	$C_{lr,cal}$ [%]
Raman spectra of solid automotive paints					
Univariate LR models					
W3_30	598–610	13.7	11.1	36.1	27.2
V3_31	612–624	18.3	0.0	37.8	31.4
W3_35	667–679	18.3	5.56	45.5	38.8
W3_84	1336–1348	17.6	5.56	52.6	36.3
V3_87	1377–1389	23.5	11.1	52.0	39.0
V3_88	1391–1403	22.2	11.1	49.2	41.4
W3_97	1514–1526	22.2	5.56	52.3	35.2
W3_98	1528–1540	30.7	0.0	58.0	45.3
Multivariate LR models					
(V3_31, V3_87)	612–624, 1377–1389	8.5	11.1	38.2	22.4
(V3_31, W3_97)	612–624, 1514–1526	11.8	0.0	23.1	18.2
Raman spectra of metallic automotive paints					
Univariate LR models					
V3_29	585–596	26.5	11.8	66.8	53.1
V3_31	612–624	28.7	5.9	110.0	52.4
V3_87	1377–1389	25.0	5.9	56.6	46.0
W3_84	1336–1348	29.4	5.9	65.6	49.1
W3_85	1350–1362	19.1	11.8	43.6	35.1
W3_88	1391–1403	29.4	5.9	60.8	50.7
W3_97	1514–1526	27.9	11.8	71.3	53.6
W3_98	1528–1540	24.3	11.8	65.6	49.5
Multivariate LR models					
(W3_85, W3_98)	1350–1362, 1528–1540	9.6	11.8	64.8	52.0
(W3_85, V3_29)	1350–1362, 585–596	14.0	5.9	42.5	29.0

evaluation) as well as the Empirical Cross Entropy approach (quantitative evaluation).

2.3.4.2.1. False negative model responses. The levels of false negative answers were evaluated by comparing Raman spectra recorded for each automotive paint (so called replicates) using the worked-out LR models. In this case measurements obtained for each sample were divided into two parts – one acts as a control sample while second acts as a recovered one. If the number of the measured spectra for the sample was even, both parts were equinumerous. Otherwise, the first part had one spectrum more than the second. Since compared spectra described the same paint, an expected answer was LR value above unity, while each LR value below unity was treated as a false negative answer. The number of comparisons performed within this experiment (N_1) was equal to the number of samples included in the database ($N_1 = m$).

2.3.4.2.2. False positive model responses. The levels of false positive answers were evaluated by comparing Raman spectra obtained for two different automotive paints using the worked-out LR models. Since they constitute two different objects, an expected answer was LR value below unity, while each value above unity was treated as false positive answer. The number of performed comparisons (N_2) was equal to two element combinations which could be established from the number of samples (m) included in database according to the equation: $N_2 = \binom{m}{2} = \frac{m(m-1)}{2}$.

2.3.4.2.3. Empirical cross entropy approach. Assessing the LR models performance based on the levels of false positive and false negative responses does not include the information about the strength of the received LR values towards each of the hypotheses. It should be highlighted that when H_1 is correct, then LR should exceed unity as much as possible and, on the contrary, when H_2 is true, then LR is supposed to be far less than 1. Empirical cross entropy [1,26] gives the opportunity to account for the LR not only qualitatively (in the form of false positive and false negative rates) but also quantitatively. Each LR value, obtained within experiments on false positive and false negative responses (so-called experimental set) has a penalty assigned, which grows with increasing strength shown towards the incorrect hypothesis [1,26] and the magnitude of the penalty depends on the prior beliefs (prior odds) about the hypotheses. The average penalty for the experimental set of LR values is computed for a series of prior probabilities and visualised in the form of ECE curve [26]. The performance of the methodology is viewed by comparing the curve with the so-called neutral curve, demonstrating the average penalty for LR=1 and calibrated curve, illustrating the penalty of the calibrated model using Pool Adjacent Violators Algorithm [1,26]. $C_{lr,exp}$ and $C_{lr,cal}$ are the respective ECE values for the experimental and calibrated LR sets for equal priors ($\Pr(H_1) = \Pr(H_2) = 0.5$), which the forensic experts usually refer to. $C_{lr,exp}$ (expressed in %) informs what is the amount of information about the correct hypotheses that is still unavailable using the model under examination. Contrastingly, when 100% is the information loss observed when LR = 1, then $100\% - C_{lr,exp}$ indicates the amount of information an expert gains after analysing the evidence in regard to the neutral evidence, when LR = 1. Then it is said that the model reduces the information loss by $100\% - C_{lr,exp}$. $C_{lr,cal}$ depicts the discrimination power of the studied model and the calibration loss is defined as $C_{lr,exp} - C_{lr,cal}$. The most effective models are those with minimal calibration loss and maximal reduction of information loss.

2.3.5. Software

Models presented in this paper were proposed by authors and they are not implemented in any commercial software. Data

treatment and subsequent LR calculations were performed in R software [36] utilizing routines developed by the authors, as well as wavelets and wavethresh packages implemented in the environment.

R routines containing models used for evaluation of the Raman spectra, as well as support how to use these routines, could be obtained from the corresponding author.

2.4. Assessment of the influence of the studied factors on Raman spectra interpretation

2.4.1. Objective magnification

Five solid and five metallic automotive paints with the same set of bands associated with pigments (copper phthalocyanine – PB 15, and dioxazine violet – PV 23) in their Raman spectra obtained with the use of the selected laser source (514.5 nm or 785 nm) were under investigation (Experiment 4 in Tables S1 and S2 in Supporting information).

Those paints were re-analysed using three various objective magnification $20\times$ (N.A. = 0.4), $50\times$ (N.A. = 0.75) and $100\times$ (N.A. = 0.85) within each of the applied laser sources (514.5 nm and 785 nm). Within each of 12 experiments (objective, laser source and group of paints) each sample was measured in four most distinct places. Apart from objective magnification (verified separately for each of two laser sources) other analytical parameters were the same.

Obtained spectra were then analysed within two approaches described below.

2.4.1.1. Influence of objective magnification on spectra variability. Within this approach spectra variability was tested for each of three objective magnifications and each group of samples (solid and metallic considered separately). Due to the fact that laser wavelength introduces additional variability according to equations $d_{x,y} = \frac{1}{\lambda_{x,y}^2}$ and $d_z = \frac{4\pi n}{\lambda_z}$, briefly described in introduction such a verification was assessed for two laser sources (514.5 nm and 785 nm). As a consequence for each of 12 experiments the within- and between-samples variability and the F-ratio from the ANOVA based on variables being areas under selected pigment bands (see Table 3 in point Results) was calculated. The comparison of the between- and within-samples variability in each of the experiments as well as F-factor value was used for deciding whether the objective magnification influences spectra variability, and if so, which objective magnification is the most suitable for measurements.

2.4.1.2. Influence of objective magnification on spectra interpretation within LR approach. Hereinauthors investigated whether objective magnification influences solving the comparison problem with the use of the likelihood ratio approach. To achieve this goal spectra obtained for particular sample under the same optimised parameters besides objective magnification were compared using previously worked-out LR models in a way that spectra representing one magnification e.g. $20\times$ act as evidence sample and that described by another magnification e.g. $50\times$ act as control sample. The results were interpreted as follows: if objective magnification does not influence spectra interpretation then during such an evaluation only correct answers occur ($LR > 1$ which indicate the correct hypotheses that compared spectra originate from the same sample), otherwise, some false negative answers ($LR < 1$ which indicate incorrect hypothesis that compared spectra originate from different paints) could be detected.

2.4.2. Influence of parameters of photobleaching pre-treatment

Three solid automotive paints (Experiment 5 in Table S1 Supporting information), which spectra obtained during ordinary

Table 3

Results concerning influence of objective magnification on spectra variability recorded for solid and metallic automotive paints depending on the applied laser source (514.5 nm or 785 nm).

Variable	Spectral range [cm ⁻¹]	Objective magnification								
		20× (N.A. 0.4)			50× (N.A. 0.75)			100× (N.A. 0.85)		
		Within-samples variance	Between-samples variance	F	Within-samples variance	Between-samples variance	F	Within-samples variance	Between-samples variance	F
		Solid automotive paints								
514.5 nm										
PV23_1	570–600	25	683	27	48	4399	92	233	694	3
PV23_2	600–635	36	441	12	45	3410	76	275	594	2
PV23_PB15_3	660–690	55	689	13	46	4395	96	66	347	2
PV23_4	1320–1368	304	6417	21	965	29,854	31	1851	9087	5
PV23_5	1368–1412	126	8135	65	3992	108,632	27	9214	24,037	3
PV23_PB15_6	1415–1465	78	1106	14	1068	7398	7	1543	5745	4
PB15_7	1515–1550	178	7280	41	377	63,175	168	1062	14,415	14
785 nm										
PB15_1	674–688	83	11767	142	15	63,846	4406	214	20,959	98
PB15_2	738–760	126	64,776	514	29	340,762	11,896	417	51,353	123
PV23_3	1370–1410	4783	55,560	12	823	270,818	335	2251	51,663	22
PV23_PB15_4	1420–1460	448	5255	12	78	20,551	257	365	483	9
PB15_5	1510–1560	718	209,608	292	150	997,956	6647	945	142,850	151
Metallic automotive paints										
514.5 nm										
PV23_1	570–600	904	4524	5	650	15,544	24	687	28	0.03
PV23_2	600–635	1012	4369	4	594	7730	13	500	111	0.20
PV23_PB15_3	660–690	3021	2498	0.83	1059	5899	6	1168	814	0.70
PV23_4	1320–1368	34,582	0.19	0.00	9134	20,279	2	8599	115,960	13
PV23_5	1368–1412	1044	2506	2	1735	1880	1	2680	3070	1
PV23_PB15_6	1415–1465	800	2600	3	1839	428,978	233	28,319	1,781,878	63
PB15_7	1515–1550	92,629	1538	0.02	25,528	24,675	1	26,882	22,011	0.82
785 nm										
PB15_1	674–688	606	5216	9	426	2012	5	1752	3464	2
PB15_2	738–760	1032	708	0.69	2082	2525	1	3708	20	0.01
PV23_3	1370–1410	3176	253,685	80	4432	883,858	199	2000	188,579	94
PV23_PB15_4	1420–1460	4608	3520	0.76	2884	1892	0.66	37,068	116,352	3.14
PB15_5	1510–1560	14,035	121,501	9	28,950	404,449	14	34,746	76,599	2

Raman measurements (514.5 nm laser source) revealed only fluorescence were subjected to photobleaching pre-treatment performed with the use of the same laser source. These paints were used in order to verify whether prolonged irradiation affects pigments degradation as well as to check whether the parameters of photobleaching, like laser power or time of irradiation, affect solving the comparison problem with the use of LR test. Performed experiments were addressed only to solid automotive paints in order to avoid misinterpretation arising from the presence of mica or alumina flakes in case of metallic paints.

2.4.2.1. Influence of prolonged irradiation on possible pigments degradation. In this part of experiments the authors verified whether prolonged irradiation may have an effect on pigments degradation described by the changes in the ratio of area under the selected pigment bands to the area of the most intensive band in spectrum. Such a verification was dictated by other studies conducted for another type of samples which indicated that prolonged irradiation may cause changes in the ratio of the selected band areas [31] or decrease some of the relative peak heights in Raman spectra recorded after such a pre-treatment [32]. Subsequently, in order to check whether such a situation occurs in case of automotive paint samples the following experiments were performed. Three selected points of each sample were irradiated using 10% of maximum laser power for a period of time equal to 15, 30, 45, 60, 75 and 90 min. After each irradiation a single scan using

the same optimised parameters was recorded. Then pigment composition for each paint (sample No. 10 dioxazine violet – PV 23 and copper phthalocyanine – PB 15, sample No. 5 and 14 rutile – PV 6 and copper phthalocyanine – PB 15) was established and characteristic pigment bands were selected (see Tables 6 and 7 in Results). Then spectra were pre-treated according to the previously described procedure. Further, the ratio of the area under selected band to the area of the most intensive band in spectrum of particular paint was computed. Calculations were performed for each spectrum recorded for the selected paint starting from this obtained after second photobleaching experiment (30 min of irradiation). The spectrum recorded after first irradiation (15 min) was left out because the fluorescence background was still very high and not all bands selected to the analysis were revealed in these spectra. In order to verify whether potential changes concerning the analysed ratio are not the effect of laser interaction during ordinary Raman measurements, obtained results (ratios) were compared with those obtained for control samples—paint having the same sets of pigments as irradiated ones but giving informative spectrum in normal Raman measurements, for which Raman analysis was conducted five times in the same spot. For this comparison Relative Standard Deviation (RSD) value (See Tables 6 and 7 in Results) were used.

2.4.2.2. Influence of photobleaching parameters on spectra interpretation within LR approach. Within this experiment

authors investigated whether parameters of photobleaching pre-treatment like laser power or time of irradiation influence solving the comparison problem of Raman spectra recorded after such a process with the use of the likelihood ratio approach. In order to establish this, experiments of photobleaching pre-treatment were repeated for above-mentioned samples in the same manner as described in previous paragraph but with the use of 5% and 50% of maximum laser power. As previously after each irradiation a single Raman scan using the same optimised parameters was recorded. Unfortunately, during experiments it occurred that 50% of laser power was too high. For two from three irradiated paints it caused thermal damages observed on their surface. As a consequence, the procedure in which 50% laser power was used was applied only for one sample. Then Raman spectra recorded for particular paint after photobleaching process (also these obtained after such a pre-treatment with the use of 10% laser power, described in previous paragraph) were pre-treated according to the procedure described in point 2.3.2 and then were compared using the worked-out LR models. In order to verify which factor, i.e. time of irradiation and laser power may have an effect on solving the comparison problem, investigated factors were considered separately.

2.4.2.2.1. Influence of time of irradiation. In order to decide whether time of irradiation established during photobleaching procedure influences spectra interpretation, spectra obtained for particular sample after this process using the same laser power e.g. 5% and different time of irradiation were compared using LR models. The spectra representing one time of irradiation e.g. 45 min act as evidence sample and that described by another time of irradiation e.g. 60 min act as control sample. The results were interpreted as follows: if time of irradiation during photobleaching process does not influence spectra interpretation then during such an evaluation only correct answers occur ($LR > 1$ which indicate a correct hypotheses that compared spectra originate from the same sample), otherwise, some false negative answers ($LR < 1$ which indicate incorrect hypothesis that compared spectra originate from different paints) could be detected.

2.4.2.2.2. Influence of laser power. In order to decide whether time of irradiation established during photobleaching procedure influences spectra interpretation, spectra obtained for particular sample after this process using the same time of irradiation e.g. 45 min and different laser power were compared using LR models. Spectra representing one laser power e.g. 5% act as evidence sample and that described by another laser power e.g. 10% act as control sample. If laser power during photobleaching process does not influence spectra interpretation then during such an evaluation only correct answers were expected ($LR > 1$), otherwise, some false negative answers ($LR < 1$) could be detected.

3. Results and discussion

3.1. LR models constructed for testing the influence of factors on Raman spectra interpretation

Detailed studies of the performance of LR models for solid and metallic 785 nm Raman spectra databases proposed for variables being areas under selected pigment bands or derived from discrete wavelet transform procedure could be found in Refs. [20,23]. Consequently, herein only results concerning univariate and multivariate LR models (false positive rates, false negative rates and ECE results) developed for solid and metallic 514.5 nm Raman spectra databases, in regard to the type of variables used for their construction are shown (Tables 1 and 2).

As could be clearly seen, irrespective of the type of variable used for LR models construction, univariate LR models proposed for

both solid and metallic Raman spectra databases deliver high levels of false positive answers and in many cases also have poor performance according to the ECE results. However, taking into account information from two variables relating to two pigments or two Raman bands (so-called bivariate models) allows to obtain satisfying levels of false positive answers as well as improves ECE models response ($C_{lr,exp}$ and $C_{lr,cal}$) leaving the number of false negative answers on a similar level. There were at least two such models, within each type of variables used for their construction, however, verification of the influence of the selected factors, is shown using one example from each type of such models.

Consequently, verification of the influence of objective magnification (514.5 nm) on Raman spectra interpretation within LR approach for solid automotive paints is shown based on bivariate models LR(PV23_7, PB15_10) and LR(W3_31, W3_97) whereas for metallic automotive paints on the following bivariate LR models LR(PV23_PB60_7, PB_10) and LR(W3_85, W3_98). The results concerning the influence of objective magnification tested for 785 nm are presented based on bivariate model LR(PB15cPG7d_2, PG7aPB15a) and naïve multivariate model LR(W3_30):LR(W3_82):LR(W3_18) for solid automotive paints and bivariate one LR(PV23aPB60c, PB15dPG7fPV23c) as well as multivariate one LR(W3_71, W3_72, W3_73):LR(W2_67):LR(W3_30) for metallic automotive paints. More details about the selected models for 785 nm could be found in Ref. [20,23].

The influence of parameters of photobleaching pre-treatment (laser power and time of irradiation) which was evaluated based on solid automotive paint samples is presented using the same models as these used for testing the influence of objective magnification (514.5 nm).

3.2. Influence of various factors on Raman spectra interpretation

3.2.1. Influence of objective magnification on spectra variability

Generally, if a studied parameter (here objective magnification described by its numerical aperture) affects spectra variability then it is imperative to select such experimental settings within optimisation process which maximize variation between measurements obtained for different samples (so-called between-sample variability) and minimize the variability among replicates of the same sample (so-called within-sample variability). Meeting such a condition ensures that data for individual samples are far more similar than the data describing different samples which further diminishes the probability of obtaining both false positive and false negative results within the comparison problem. If this becomes difficult to choose due to the fact that the maximal between-samples variance is observed for one experimental setting while minimal within-sample variance for another one, then the ratio of those variances (known as F-factor) could be used in order to decide which parameter setting is the most appropriate. Consequently, the most preferable parameter is this delivering the highest F-factor values. However, observing similar F-factor values in various experiments does not mean that there is no influence of the tested parameter on the spectra variability. It may happen that both sources of variability (between- and within-samples variance) are changing equally quickly, leaving the F-factor unchanged.

The effect of objective magnification on samples variability within the applied laser wavelength used for samples excitation (514.5 nm and 785 nm) for two groups of analysed samples (solid and metallic considered separately) is presented in Table 3.

Taking into account all parameters (within- and between-samples variability as well as F-factor values) it could be stated that objective magnification affects samples variability for both groups of samples regardless of the applied laser source. In the case of solid automotive paints maximum of between-sample variability and the greatest F-factor values are observed when 50× objective

lens is used. For metallic automotive paints results are not that clear, probably due to the presence of mica or alumina flakes in this type of paints which introduces additional variability. Nevertheless for the majority of variables the results obtained when 50× objective lens is used are better than these obtained when 20× or 100× magnification is used, or at least, they are comparable. As a consequence 50× objective lens (N.A. = 0.75) was chosen as the best magnification which is recommended for focusing the laser on the sample during Raman measurements.

Presented results are consistent with those obtained by Ferreira's group [33] who selected this magnification based on quality of spectra described by signal to noise ratio. However, they are in contrary to Lambert's investigation [34], performed for two samples, who stated that objective magnification (20× and 50× were tested) does not affect spectra variability.

3.2.2. Influence of objective magnification on spectra interpretation within LR approach

Results concerning the influence of objective magnification on solving the comparison problem with the use of LR approach for solid and metallic automotive paints represented by their Raman spectra obtained using 514.5 nm and 785 nm laser source are presented in Tables 4 and 5 respectively.

These results demonstrate the significant impact of objective magnification on the number of false negative responses delivered by LR models regardless of the type of variables used for their construction. Such false negative models responses for the comparison of the selected paint, which spectra were recorded using two different magnifications, occur for both solid and metallic samples regardless of the laser source (514.5 nm or 785 nm). For control comparisons (comparison of the spectra for

Table 4

Results (LR values) concerning the influence of objective magnification on solving the comparison problem with the use of LR test for solid automotive paints represented by their Raman spectra (514.5 nm and 785 nm). Details concerning samples origins could be found in Table S1 in Supplementary information (Experiment 4).

Laser wavelength	Sample 6			Sample 9			Sample 25			
514.5 nm	LR(PV23_7, PB 15_10)									
	20×	20× ^a	50×	100×	20×	50×	100×	20×	50×	100×
	50×	171 ^b			123			170		
	50×	55	50		0.3	128		300	158	
	100×	3 × 10 ⁻⁵	8 × 10 ⁻⁷	18	56	2 × 10 ⁻⁴	156	67	199	3
	LR(V3_31, W3_97)									
	20×	20×	50×	100×	20×	50×	100×	20×	50×	100×
	50×	42			57			70		
	50×	105	9		11	62		46	8	
	100×	1 × 10 ⁻³	0.01	65	37	81	60	16	78	5
	785 nm	LR(PB15cPG7d_2, PG7aPB15)								
20×		20×	50×	100×	20×	50×	100×	20×	50×	100×
50×		43			50			10		
50×		64	4		4	13		16	29	
100×		2 × 10 ⁻¹⁰	6 × 10 ⁻⁸	77	5 × 10 ⁻⁵	2 × 10 ⁻¹²	7	6 × 10 ⁻⁷	5 × 10 ⁻¹³	6 × 10 ⁻⁷
LR(V3_30)-LR(W3_82)-LR(W3_18)										
20×		20×	50×	100×	20×	50×	100×	20×	50×	100×
50×		0.9			1.5			1		
50×		1.4	1.2		0.09	1.5		1.4	1.2	
100×		1.3	1.3	1.2	0.3	1.4	1.2	1.2	1.3	1
514.5 nm		Sample 26			Sample 31					
	LR(PV23_7, PB 15_10)									
	20×	20×	50×	100×	20×	50×	100×			
	20×	599			5					
	50×	557	560		8	15				
	100×	14	8	407	33	0.01	1.4			
	LR(V3_31, W3_97)									
	20×	20×	50×	100×	20×	50×	100×			
	50×	64			49					
	100×	2	58		77	48				
	100×	1 × 10 ⁻³	21	69	0.8	11	24			
785 nm	LR(PB15cPG7d_2, PG7aPB15)									
	20×	20×	50×	100×	20×	50×	100×			
	50×	1 × 10 ⁶			22					
	50×	1 × 10 ⁶	1 × 10 ⁶		2	3				
	100×	6 × 10 ⁵	3 × 10 ⁸	1 × 10 ⁶	4 × 10 ⁻¹⁶	3 × 10 ⁻⁷	95			
	LR(V3_30)-LR(W3_82)-LR(W3_18)									
	20×	20×	50×	100×	20×	50×	100×			
	50×	1.1			1.3					
	50×	1.2	1.2		1.5	1.1				
	100×	1.3	1.3	3 × 10 ⁻⁴	1.5	1.4	0.8			

^a Objective magnification used for focusing on the sample during Raman measurements: 20× (N.A. = 0.4), 50× (N.A. = 0.75) and 100× (N.A. = 0.85).

^b LR > 1 is an expected answer suggesting lack of influence of the tested parameter on the samples comparison (details are provided in the text).

Table 5

Results (LR values) concerning the influence of objective magnification on solving the comparison problem with the use of LR test for metallic automotive paints represented by their Raman spectra (514.5 and 785 nm). Details concerning samples origins could be found in Table S2 in Supplementary information (Experiment 4).

Laser wavelength	Sample 23			Sample 26			Sample 34		
514.5 nm	LR(PV23_PB60_7, PB_10)								
	20×	20×	50×	100×	20×	50×	100×	20×	50×
	13 ^b				13			13	
	50×	22	14		0.1	3		24	13
	100×	21	26	10	5 × 10 ⁻³	19	7	23	26
									14
	LR(W3_85, W3_98)								
	20×	20×	50×	100×	20×	50×	100×	20×	50×
	30				8			26	
	50×	35	15		4 × 10 ⁻⁶	0.1		5	22
100×	56	49	5	4 × 10 ⁻⁹	56	26	9	43	
								25	
785 nm	LR(PV23aPB60c, PB15dPG7(PV23c)								
	20×	20×	50×	100×	20×	50×	100×	20×	50×
	45				87			22	
	50×	41	48		3 × 10 ⁻⁴	26		17	54
	100×	69	100	48	20	1 × 10 ⁻⁵	32	3	45
									41
	LR(W3_71,W3_72,W3_73)-LR(W2_67)-LR(V3_30)								
	20×	20×	50×	100×	20×	50×	100×	20×	50×
	164				25			7	
	50×	3 × 10 ⁻⁴	51		1 × 10 ⁻⁴	17		10	17
100×	8 × 10 ⁻¹²	0.9	4.2	18	1 × 10 ⁻⁴	47	5	37	
								15	
514.5 nm	Sample 36			Sample 40					
	LR(PV23_PB60_7, PB_10)								
	20×	20×	50×	100×	20×	50×	100×		
	14				13				
	50×	22	13		9	4			
	100×	24	20	5	7	30	1.5		
	LR(W3_85, W3_98)								
	20×	20×	50×	100×	20×	50×	100×		
	26				24				
	50×	0.3	6		27	20			
100×	0.7	17	3	1.4	13	22			
785 nm	LR(PV23aPB60c, PB15dPG7(PV23c)								
	20×	50×	100×	20×	50×	100×			
	70			153					
	50×	49	37	109	181				
	100×	9	104	54	44	284	207		
	LR(W3_71,W3_72,W3_73)-LR(W2_67)-LR(V3_30)								
	20×	50×	100×	20×	50×	100×			
	19			119					
	50×	5	5	41	41				
	100×	17	14	7	106	63	42		

^a Objective magnification used for focusing on the sample during Raman measurements: 20× (N.A. = 0.4), 50× (N.A. = 0.75) and 100× (N.A. = 0.85).

^b LR > 1 is an expected answer suggesting lack of influence of the tested parameter on the samples comparison (details are provided in the text).

the selected paint recorded under the same parameters including objective magnification) in few cases some false negative LR model responses are also detected. This could be caused by the way how the spectra are compared. In case in which the influence of objective magnification is tested three spectra recorded using one magnification e.g. 20× act as evidence sample and three spectra recorded using another magnification i.e. 50× act as control sample while for control comparisons one spectrum acts as evidence sample while two act as control one. Therefore information about sample inhomogeneity in this last experiment is not included. Nevertheless despite such observations appear for control comparisons their number is definitely lower than that observed for comparisons where objective magnification is studied. As a consequence, it can be stated that regardless of the laser source used for Raman spectra recording the same objective magnification should be used for focusing on the control and evidence samples

during Raman measurements when interpretation within comparison problem is made with the use of LR approach.

3.2.3. Influence of prolonged irradiation during photobleaching process on possible pigment degradation

Preliminary study concerning possible detrimental influence of prolonged irradiation of paints during photobleaching process on the position and shape of pigment bands revealed in Raman spectra obtained after such a pre-treatment was described previously [30]. So herein authors focus only on potential pigments degradation within this process understood as quantitative changes in the ratio of the area under selected pigment bands to the area of the most intensive band in spectrum. Obtained results for all three irradiated paints were constant therefore here only examples for two of them having different pigment composition are presented (Tables 6 and 7).

Table 6

Results concerning influence of prolonged irradiation during photobleaching pre-treatment on quantitative changes in pigments bands areas revealed in Raman spectra recorded after such a process for sample No. 10 (details concerning paint origins could be found in Table S1 Supplementary information).

t_i [min]	Pigment				
	Irradiated paint no 10				
	PV 23 570–602 cm ⁻¹	PV 23 612–635 cm ⁻¹	PV 23 + PB 15 1320–1368 cm ⁻¹	PV 23 1412–1439 cm ⁻¹	PB 15 1515–1550 cm ⁻¹
30	0.130 ^a	0.120	0.398	0.302	0.156
45	0.124	0.119	0.411	0.296	0.158
60	0.131	0.122	0.393	0.303	0.170
75	0.130	0.122	0.388	0.301	0.190
90	0.134	0.124	0.375	0.297	0.162
Mean	0.130	0.122	0.393	0.300	0.167
RSD [%]	3.0	1.6	3.3	1.0	8.3
Control paint no 6					
1	0.092	0.094	0.311	0.283	0.021
2	0.093	0.095	0.303	0.278	0.041
3	0.092	0.094	0.314	0.277	0.044
4	0.095	0.096	0.310	0.275	0.050
5	0.100	0.098	0.318	0.266	0.075
Mean	0.095	0.095	0.311	0.276	0.046
RSD [%]	3.6	2.0	1.7	2.2	42.2

^a Ratio of area of the selected pigment band to the area of the most intensive band in spectrum (here band associated with PV 23; range 1368–1412 cm⁻¹).

Table 7

Results concerning influence of prolonged irradiation during photobleaching pre-treatment on quantitative changes in pigments bands areas revealed in Raman spectra recorded after such a process for sample No. 14 (details concerning paint origins could be found in Table S1 Supplementary information).

t_i [min]	Pigment				
	Irradiated paint no 14				
	PW 6 380–500 cm ⁻¹	PW 6 + PB 15 540–660 cm ⁻¹	PB 15 680–710 cm ⁻¹	PB 15 1315–1355 cm ⁻¹	PB 15 1434–1462 cm ⁻¹
30	0.484 ^a	0.670	0.242	0.441	0.251
45	0.457	0.630	0.219	0.421	0.255
60	0.512	0.687	0.219	0.410	0.254
75	0.439	0.674	0.211	0.409	0.260
90	0.457	0.663	0.210	0.418	0.260
Mean	0.470	0.665	0.220	0.420	0.56
RSD [%]	6.1	3.2	5.9	3.1	1.5
Control paint no 1					
1	0.826	0.837	0.272	0.431	0.290
2	0.783	0.978	0.277	0.430	0.260
3	0.776	0.798	0.230	0.388	0.252
4	0.730	0.750	0.208	0.413	0.249
5	0.756	0.791	0.219	0.410	0.250
Mean	0.774	0.831	0.241	0.414	0.260
RSD [%]	4.6	10.6	13.0	4.2	6.6

^a Ratio of area of the selected pigment band to the area of the most intensive band in spectrum (here band associated with PB 15; range 1515–1550 cm⁻¹).

Obtained results indicated that prolonged irradiation does not significantly affect pigments bands. In contrary to other examinations [31,32] slight changes in particular ratios do not show any tendency (increase or decrease). What is more changes observed in particular ratios calculated for irradiated paints (RSD value) are definitely smaller than that observed for control samples for which Raman spectra were measured five times in the same spot. As a consequence it can be stated that prolonged irradiation of automotive paints during photobleaching pre-treatment does not quantitatively affect pigment bands areas.

3.2.4. Influence of time of irradiation during photobleaching process on spectra interpretation within LR approach

The effect of time of irradiation upon established laser power during photobleaching process on solving the comparison problem of spectra with the use of LR test is shown in Table 8.

Obtained results delivered by LR models irrespective of type of variables used for their construction indicate that within the selected laser power changes in time of irradiation during such a pre-treatment do not affect solving the comparison problem. Almost for all of the performed comparisons in which influence of

Table 8

Influence of time of irradiation upon the established laser power during photobleaching pre-treatment on solving the comparison problem of Raman spectra with the use of the likelihood ratio approach.

Laser power		LR models									
		LR(PV23_7, PB15_10)					LR(V3_31, W3_97)				
		Sample 5 ^a									
		45 ^b min	60 min	75 min	90 min		45 min	60 min	75 min	90 min	
5%	45 min ^b	21 ^c					45 min	135			
	60 min	294	184				60 min	315	53		
	75 min	195	443	13			75 min	525	320	195	
	90 min	211	450	469	136		90 min	303	292	397	
10%	45 min	0.04					45 min	11		73	
	60 min	6	78				60 min	429	12		
	75 min	244	0.1	96			75 min	329	410	44	
	90 min	459	11	189	47		90 min	479	336	266	
Sample 10											
		45 min	60 min	75 min	90 min		45 min	60 min	75 min	90 min	
5%	45 min	127					45 min	0.2			
	60 min	285	129				60 min	100	6		
	75 min	339	362	163			75 min	25	30	5	
	90 min	359	338	368	139		90 min	39	45	88	
10%	45 min	140					45 min	3		14	
	60 min	352	146				60 min	79	14		
	75 min	356	361	147			75 min	67	90	40	
	90 min	317	286	305	110		90 min	49	68	68	
50%	45 min	90					45 min	12			
	60 min	340	121				60 min	11	9		
	75 min	296	452	59			75 min	0.99	5	3	
	90 min	124	272	345	125		90 min	1.5	36	49	
Sample 14											
		45 min	60 min	75 min	90 min		45 min	60 min	75 min	90 min	
5%	45 min	170					45 min	162			
	60 min	425	88				60 min	467	176		
	75 min	451	359	201			75 min	469	529	206	
	90 min	290	170	367	5		90 min	430	466	462	
10%	45 min	135					45 min	0.004			
	60 min	347	199				60 min	166	3		
	75 min	440	430	186			75 min	126	321	10	
	90 min	457	403	465	211		90 min	44	91	360	

^a Details concerning samples origins could be found in Table S1 in Supplementary information.

^b Time of irradiation of photobleaching pre-treatment.

^c LR > 1 is an expected answer suggesting lack of influence of the tested parameter on the samples comparison (details are provided in the text).

time of irradiation is tested only correct answers are observed (LR > 1). Likewise, similar results were observed for control comparisons in which all parameters were the same. As a consequence it seems that within constant laser power time of irradiation does not have to be strictly controlled because it does not have an impact on solving the comparison problem within LR tests. Even though such results are obtained for different time of irradiation within each of the established laser power, results obtained for 50% laser power should be interpreted cautiously because they were checked only for one automotive paint sample.

3.2.5. Influence of laser power during photobleaching process on spectra interpretation within LR approach

Results concerning the influence of laser power upon established time of irradiation during photobleaching process on solving the comparison problem with the use of LR test are presented in Table 9.

Obtained results delivered by LR models irrespective of variables used for their construction demonstrate that changing 5% laser power to 10% laser power during photobleaching process

upon established time of irradiation, e.g. 45 min, does not affect solving the comparison problem with the use of LR test. Within such comparisons, likewise for the majority of control comparisons (Raman spectra compared for the selected paint recorded using the same parameters of photobleaching pre-treatment), only correct answers (LR value above unity) are observed. On the other hand when comparing the spectra of paint No. 14 (the only paint which could be irradiated also with the use of 50% laser power) after its irradiation with changing laser power from 5% to 50% or from 10% to 50% upon constant time of irradiation false negative model response mainly from LR models constructed based on variables derived from DWT procedure occur. Consequently it seems that within established time of irradiation 5% and 10% laser power can be used interchangeably because it does not have an impact on solving a comparison problem within application of LR tests. However, the results obtained upon established time of irradiation in which 50% laser power is used for irradiation of one sample, e.g. control one, while for evidence sample another laser power is used should not be compared because it may distort the conclusions within comparison problem solved with the use of LR test.

Table 9

Influence of laser power upon established time of irradiation during photobleaching pre-treatment on solving the comparison problem of Raman spectra with the use of the likelihood ratio approach.

Sample		Time of irradiation [min]											
		45			60			75			90		
		LR(PV 23_7, PB 15_10)											
		5% ^b	10%		5%	10%		5%	10%		5%	10%	
5 ^a	5%	21 ^c			184			13			136		
	10%	95	0.04		50	78		128	96		440	47	
14	5%	170			88			201			5		
	10%	463	135		258	199		465	186		318	211	
10	5%			50%	5%	10%	50%	5%	10%	50%	5%	10%	50%
	10%	127			129			163			139		
	10%	179	140		220	146		224	147		234	110	
	50%	208	18	90	12	25	121	14	12	59	3	0.2	125
		LR(V3_31, W3_97)											
5	5%	135			53			195			73		
	10%	1.7	11		88	12		28	44		2	47	
14	5%	162			177			206			139		
	10%	8	0.003		4	3		58	10		201	78	
10	5%			50%	5%	10%	50%	5%	10%	50%	5%	10%	50%
	10%	0.2			5			5			14		
	10%	78	3		54	14		79	40		52	21	
	50%	49	39	12	0.6	2	9	0.05	0.006	3	0.1	0.02	7

^a Details concerning samples origins could be found in Table S1 in Supplementary information.

^b Laser power of photobleaching pre-treatment.

^c LR > 1 is an expected answer suggesting lack of influence of the tested parameter on the samples comparison (details are provided in the text).

4. Conclusions

The main aim of this study was to verify whether analytical factors like objective magnification used for focusing the laser on the sample during ordinary Raman measurements as well as parameters of photobleaching pre-treatment, like laser power or time of irradiation affect solving the comparison problem with the use of LR approach.

Among those factors objective magnification described by its numerical aperture seems to have an important impact on solving the comparison problem of both solid and metallic automotive paints regardless of the laser source used for recording Raman signal (514.5 nm and 785 nm) and type of LR models (constructed based on band areas variables or derived from DWT procedure) used for such a verification. Hence, the same objective magnification, preferably 50× (established from the analysis of within- and between-sample variability as well as F-factor value) should be used when focusing the laser on samples during Raman measurements.

Analysis of parameters of photobleaching pre-treatment performed on a group of solid automotive paint samples shows that time of irradiation upon established laser power does not affect solving the comparison problem with the use of LR test. Likewise upon established time of irradiation 5% or 10% laser power could be used interchangeably without changing conclusions within this problem. However, upon established time of irradiation changes in laser power between control and recovered samples from 5% or 10% to 50% may cause erroneous conclusions. Finally it was also proved that prolonged irradiation of automotive paints during photobleaching process does not quantitatively affect pigment bands areas revealed in Raman spectrum after such a pre-treatment.

To sum up, in order to reliably solve the comparison problem of paints based on their Raman spectra 50× objective

magnification is recommended for focusing the laser on the surface of both recovered (unknown) and reference sample. For both analysed paints at least three measurements performed in the most distinct spots should be recorded. For fluorescent paints the photobleaching pre-treatment is suggested prior to normal Raman measurements. If possible, during this process, 10% of laser power should be applied. The irradiation may be carried out till obtaining informative spectra. LR bivariate models constructed for comparing Raman spectra delivered low levels of false positive and false negative responses as well as acceptable ECE results. The LR outcomes are satisfactory for both types of models, i.e. based on areas of the selected pigment bands or coefficients derived from DWT procedure. Hence, each bivariate LR model may be used while solving the comparison problem of Raman spectra.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2017.10.034>.

References

- [1] G. Zadora, A. Martyna, D. Ramos, C. Aitken, Statistical Analysis in Forensic Science: Evidential Value of Multivariate Physicochemical Data, Wiley, Chichester, 2014.
- [2] B. Caddy (Ed.), Forensic Examination of Glass and Paint—Analysis and Interpretation, Taylor & Francis, CRC Press, London, New York, 2001.
- [3] J. Nieznańska, J. Zięba-Palus, P. Kościelniak, Physico-chemical study of car paints coats, Probl. Forensic Sci. 39 (1999) 77–94.
- [4] G. Massonnet, W. Stoecklein, Identification of organic pigments in coatings: applications to red automotive topcoats. Part I: thin layer chromatography with direct visible microspectrophotometric detection, Justice 39 (2) (1999) 128–134.
- [5] J. Zięba-Palus, B.M. Trzcinańska, Study of pigments composition in paint traces by microspectrometric techniques, Probl. Forensic Sci. 89 (2012) 5–16.

- [6] P. Buzzini, G. Massonnet, A market study of green spray paints by Fourier transform infrared (FTIR) and Raman spectroscopy, *Sci. Justice* 44 (3) (2004) 123–131.
- [7] J. Zięba-Palus, A. Michalska, A. Weselucha-Birczyńska, A characterisation of paint samples by infrared and Raman spectroscopy for criminalistic purposes, *J. Mol. Struct.* 993 (2011) 134–141.
- [8] J. Zięba-Palus, A. Michalska, Characterization of blue pigments used in automotive paints by Raman spectroscopy, *J. Forensic Sci.* 59 (4) (2014) 943–949.
- [9] J. Zięba-Palus, J.M. Milczarek, G. Zadora, Differentiation and evaluation of evidence value of styrene acrylic urethane topcoat car paints analysed by pyrolysis-gas chromatography, *J. Chromatogr. A* 1179 (2008) 47–58.
- [10] G. Massonnet, W. Stoecklein, Identification of organic pigments in coatings: applications to red automotive topcoats. Part II: infrared spectroscopy, *Sci. Justice* 39 (2) (1999) 135–140.
- [11] J. Zięba-Palus, J. Wąs-Gubała, An investigation into the use of micro-Raman spectroscopy for the analysis of car paints and single textile fibres, *J. Mol. Struct.* 993 (2011) 127–133.
- [12] C. Muehlethaler, G. Massonnet, P. Buzzini, Influence of shaking time on the forensic analysis of FTIR and Raman spectra of spray paints, *Forensic Sci. Int.* 237 (2014) 78–85.
- [13] C.G.G. Aitken, D. Lucy, Evaluation of trace evidence in the form of multivariate data, *J. R. Stat. Soc. Ser. C (Appl. Stat.)* 53 (2004) 109–122.
- [14] C.G.G. Aitken, G. Zadora, D. Lucy, A two-level model for evidence evaluation, *J. Forensic Sci.* 52 (2007) 412–419.
- [15] E. Alladio, A. Martyna, A. Salomone, V. Pirro, M. Vincenti, G. Zadora, Evaluation of direct and indirect ethanol biomarkers using a likelihood ratio approach to identify chronic alcohol abusers for forensic purposes, *Forensic Sci. Int.* 271 (2017) 13–22.
- [16] A. Bolck, I. Alberink, Variation in likelihood ratios for forensic evidence evaluation of XTC tablets comparison, *J. Chemom.* 25 (2010) 41–49.
- [17] A. van Es, W. Wiarda, M. Hordijk, I. Alberink, P. Vergeer, Implementation and assessment of a likelihood ratio approach for the evaluation of LA-ICP-MS evidence in forensic glass analysis, *Sci. Justice* 57 (2017) 181–192.
- [18] A. Martyna, D. Lucy, G. Zadora, B.M. Trzcinska, D. Ramos, A. Parczewski, The evidential value of microspectrophotometry measurements made for pen inks, *Anal. Methods* 5 (2013) 6788–6795.
- [19] A. Martyna, K.-E. Sjustad, G. Zadora, D. Ramos, Analysis of lead isotopic ratios of glass objects with the aim of comparing them for forensic purposes, *Talanta* 105 (2013) 158–166.
- [20] A. Martyna, A. Michalska, G. Zadora, Interpretation of FTIR spectra of polymers and Raman spectra of car paints by means of likelihood ratio approach supported by wavelet transform for reducing data dimensionality, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 3357–3376.
- [21] A. Martyna, G. Zadora, T. Neocleous, A. Michalska, N. Dean, Hybrid approach combining chemometrics and likelihood ratio framework for reporting the evidential value of spectra, *Anal. Chim. Acta* 931 (2016) 34–46.
- [22] A. Martyna, G. Zadora, I. Stanimirova, D. Ramos, Wine authenticity verification as a forensic problem. An application of likelihood ratio approach to label verification, *Food Chem.* 150 (2014) 287–295.
- [23] A. Michalska, A. Martyna, J. Zięba-Palus, Application of likelihood ratio approach in solving a comparison of Raman spectra recorded for blue automotive paints, *J. Raman Spectrosc.* 46 (2015) 772–783.
- [24] C. Neumann, P. Margot, New perspectives in the use of ink evidence in forensic science. Part III: operational applications and evaluation, *Forensic Sci. Int.* 192 (2009) 29–42.
- [25] G. Pierrini, S. Doyle, C. Champod, T. Taroni, D. Wakelin, C. Lock, Evaluation of preliminary isotopic analysis (¹³C and ¹⁵N) of explosives. A likelihood ratio approach to assess the links between Semtex samples, *Forensic Sci. Int.* 167 (2007) 43–48.
- [26] D. Ramos, J. Gonzalez-Rodriguez, G. Zadora, C.G.G. Aitken, Information-theoretical assessment of the performance of likelihood ratio computation methods, *J. Forensic Sci.* 58 (2013) 1503–1518.
- [27] P. Wlasiuk, A. Martyna, G. Zadora, A likelihood ratio model for the determination of the geographical origin of olive oil, *Anal. Chim. Acta* 853 (2015) 187–199.
- [28] C.S. Palenik, S. Palenik, E. Groves, J. Herb, Raman Spectroscopy of Automotive and Architectural Paints: In situ Pigment Identification and Evidentiary Significance. www.ncjrs.gov/pdffiles1/nij/grants/243162.pdf. (Accessed 12 March 2014).
- [29] D. Wei, S. Chen, Q. Liu, Review of fluorescence suppression techniques in Raman spectroscopy, *Appl. Spectrosc. Rev.* 50 (2015) 387–406.
- [30] J. Zięba-Palus, A. Michalska, Photobleaching as a useful technique in reducing of fluorescence in Raman spectra of blue automobile paint samples, *Vibrational Spectrosc.* 74 (2014) 6–12.
- [31] K. Golcuk, G.S. Mandair, A.F. Callender, N. Sahar, D.H. Kohn, M.D. Morris, Is photobleaching necessary for Raman imaging of bone tissue using a green laser? *Biochim. Biophys. Acta* 1758 (2006) 868–873.
- [32] A.M. Macdonald, P. Wyeth, On the use of photobleaching to reduce fluorescence background in Raman spectroscopy to improve the reliability of pigment identification on painted textiles, *J. Raman Spectrosc.* 37 (2006) 830–835.
- [33] K.B. Ferreira, A.G.G. Oliveira, J.A. Gomes, Raman spectroscopy of automotive paints: forensic analysis of variability and spectral quality, *Spectrosc. Lett.* 50 (2) (2017) 102–110.
- [34] D. Lambert, C. Muehlethaler, L. Gueissaz, G. Massonnet, Raman analysis of multilayer automotive paints in forensic science: measurement variability and depth profile, *J. Raman Spectrosc.* 45 (2014) 1285–1292.
- [35] I. Daubechies, Ten Lectures on Wavelets, CBMS-NSF Regional Conference, Series in Applied Mathematics, Philadelphia, 1992.
- [36] R. Core Team, R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2012. <http://www.R-project.org/>.

Table S1. List of solid blue automotive paints which spectra (marked by X) were taken into account within the considered experiments.

No	Vehicle	Experiment 1 ^{a)}	Experiment 2 ^{b)}	Experiment 3 ^{c)}	Experiment 4 ^{d)}	Experiment 5 ^{e)}
1	Citroen	X	X	X		
2	Fiat 126p	X	X	X		
3	Fiat Seicento		X	X		
4	Fiat 126p		X	X		
5	Fiat 125p		X	X		X
6	Renault Twingo	X	X	X	X	
7	Lada	X	X	X		
8	Lada		X	X		
9	Fiat 126p	X	X	X	X	
10	Citroen		X	X		X
11	Citroen	X	X	X		
12	VW		X	X		
13	Suzuki	X	X	X		
14	Lada		X	X		X
15	Renault Megane	X	X	X		
16	Citroen		X	X		
17	Fiat 126p	X	X	X		
18	Polonez		X	X		
19	Skoda	X	X	X		
21	Renault Twingo		X	X		
22	Fiat Punto		X	X		
23	Polonez	X	X	X		
24	Polonez		X	X		
25	Opel Astra	X	X	X	X	
26	Fiat Seicento	X	X	X	X	
27	VW Golf	X		X		
28	Fiat 125p	X		X		
29	Ford Escord	X		X		
30	Ford Fiesta GL	X		X		
31	Renault Fengo	X		X	X	

^{a)} Experiment 1 – automotive paint samples which Raman spectra obtained with the use of 514.5 nm laser source were used for development of LR models proposed for two types of variables – areas under selected pigment bands and selected by the discrete wavelet transform procedure.

^{b)} Experiment 2 – automotive paint samples which Raman spectra obtained with the use of 785 nm laser source were used for development of LR models proposed for variables being areas under selected pigment bands.

^{c)} Experiment 3 – automotive paint samples which Raman spectra obtained with the use of 785 nm laser source were used for development of LR models construction proposed for variables selected in the discrete wavelet transform procedure.

^{d)} Experiment 4 – automotive paint samples based on which influence of objective magnification was tested.

^{e)} Experiment 5 – automotive paint samples based on which parameters of photobleaching pre-treatment were tested.

Table S2. List of metallic blue automotive paints which spectra (marked by X) were taken into account within the considered experiments.

No	Vehicle	Experiment 1 ^{a)}	Experiment 2 ^{b)}	Experiment 3 ^{c)}	Experiment 4 ^{d)}
1	Ford Sierra		X	X	
2	Fiat 126p		X	X	
4	Fiat 126p		X	X	
5	VW Golf		X	X	
6	Citroen		X	X	
8	Toyota Camry		X	X	
9	Citroen		X	X	
10	Citroen	X	X	X	
11	Citroen	X	X	X	
12	Volvo		X	X	
14	VW		X	X	
20	Subaru		X	X	
21	Fiat Seicento		X	X	
22	Honda Civic	X	X	X	
23	Citroen Saxo	X	X	X	X
24	Citroen	X	X	X	
25	Renault Clio RN		X	X	
26	BMW	X	X	X	X
27	nn	X	X	X	
28	nn	X			
29	nn	X	X	X	
30	VW Passat	X	X	X	
31	Fiat Cinquecento		X	X	
32	Ford Escort	X	X	X	
33	Opel Astra	X	X	X	
34	Mazda 3	X	X	X	X
35	Alfa Romeo	X	X	X	
36	Vauxhall Vestra 2.0	X	X	X	X
37	VW Golf	X	X	X	
38	Volvo S40		X	X	
39	Nissan		X	X	
40	Fiat Uno	X			X

^{a)} Experiment 1 – automotive paint samples which Raman spectra obtained with the use of 514.5 nm laser source were used for development of LR models proposed for two types of variables – areas under selected pigment bands and selected by the discrete wavelet transform procedure.

^{b)} Experiment 2 – automotive paint samples which Raman spectra obtained with the use of 785 nm laser source were used for development of LR models proposed for variables being areas under selected pigment bands.

^{c)} Experiment 3 – automotive paint samples which Raman spectra obtained with the use of 785 nm laser source were used for development of LR models construction proposed for variables selected in the discrete wavelet transform procedure.

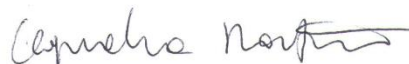
^{d)} Experiment 4 – automotive paint samples based on which influence of objective magnification was tested.

Kraków, dnia 3 listopada 2017 r.

Oświadczenie

Oświadczam, iż w publikacji *Investigation of various factors influencing Raman spectra interpretation with the use of likelihood ratio approach* opublikowanej w *Forensic Science International*, 10.1016/j.forsciint.2017.10.034, mój udział polegał na:

- przeprowadzeniu stosownych obliczeń ilorazu wiarygodności dla ustalonych zmiennych,
- współpracy w ocenie i interpretacji wyników,
- współtworzeniu publikacji i formułowaniu odpowiedzi na recenzje.



dr Agnieszka Martyna

Zakład Chemii Analitycznej
Instytut Chemii
Uniwersytet Śląski w Katowicach
ul. Szkolna 9, 40-003 Katowice

INSTYTUT EKSPERTYZ SĄDOWYCH

im. Prof. dra Jana Sehna

PL 31-033 Kraków, ul. Westerplatte 9
tel. (+48 12) 61 85 700, fax (+48 12) 422 38 50
e-mail: ics@ics.krakow.pl

Kraków, dnia 3 listopada 2017 r.

Oświadczenie

Oświadczam, iż w publikacji *Investigation of various factors influencing Raman spectra interpretation with the use of likelihood ratio approach* opublikowanej w Forensic Science International, 10.1016/j.forsciint.2017.10.034, mój udział polegał na:

- współpracy w formułowaniu ogólnej koncepcji badań,
- merytorycznym nadzorze procesu przygotowania publikacji i odpowiedzi na recenzje.



dr hab. Grzegorz Zadora, prof. IES

Instytut Ekspertyz Sądowych
im. Prof. dra Jana Sehna w Krakowie
ul. Westerplatte 9, 31-033 Kraków

Zakład Chemii Analitycznej
Instytut Chemii
Uniwersytet Śląski w Katowicach
ul. Szkolna 9, 40-003 Katowice

INSTYTUT EKSPERTYZ SĄDOWYCH

im. Prof. dra Jana Sehna

PL 31-033 Kraków, ul. Westerplatte 9
tel. (+48 12) 61 85 700, fax (+48 12) 422 38 50
e-mail: ies@ies.krakow.pl

Kraków, dnia 3 listopada 2017 r.

Oświadczenie

Oświadczam, iż w publikacji *Investigation of various factors influencing Raman spectra interpretation with the use of likelihood ratio approach* opublikowanej w Forensic Science International, 10.1016/j.forsciint.2017.10.034, mój udział polegał na:

- współpracy w formułowaniu ogólnej koncepcji badań,
- przeprowadzeniu analiz lakierów samochodowych z wykorzystaniem spektrometrii ramanowskiej,
- opracowaniu metodologii wstępnego naświetlania próbek,
- opracowaniu metodologii oceny wpływu obiektywu na uzyskiwane widma Ramana,
- zaplanowaniu eksperymentów obliczeniowych, w tym wybór zmiennych posiadających odpowiedni kontekst chemiczny,
- współudziale w interpretacji uzyskanych wyników,
- tworzeniu publikacji i formułowaniu odpowiedzi na recenzje,
- przeprowadzeniu procedury redakcyjnej.

Aleksandra Michalska

Instytut Ekspertyz Sądowych
im. Prof. dra Jana Sehna w Krakowie
ul. Westerplatte 9, 31-033 Kraków

ZAŁĄCZNIK C

Załącznik C – Życiorys**Aleksandra Michalska****Data urodzenia:** 11 stycznia 1984 roku**Email:** amichalska@ies.krakow.pl
aleksandra_michalska@interia.pl**Wykształcenie**

10/2007-06/2008 – studia podyplomowe w zakresie systemowego zarządzania jakością; Uniwersytet Ekonomiczny w Krakowie, Polska. Temat pracy dyplomowej: *Przygotowanie pracowni badania mikrośladów do akredytacji*.

10/2002-06/2007 – studia magisterskie; Wydział Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, Polska; specjalizacja: chemia analityczna. Temat pracy magisterskiej: *Badania morfologii, struktury i składu chemicznego charakterystycznych cząstek powystrzałowych metodami fizykochemicznymi*.

Doświadczenie zawodowe

09/2007 – 03/2016: technik analityk; Pracownia Badania Mikrośladów, Instytut Ekspertyz Sądowych im. Prof. dra Jana Sehna, Kraków, Polska.

04/2016 – obecnie: asystent; Pracownia Badania Mikrośladów, Instytut Ekspertyz Sądowych im. Prof. dra Jana Sehna, Kraków, Polska.

07/2017 – obecnie: asystent, biegły z zakresu fizykochemicznych badań kryminalistycznych; Pracownia Badania Mikrośladów, Instytut Ekspertyz Sądowych im. Prof. dra Jana Sehna, Kraków, Polska.

Szkolenia

4-6 maja 2008 – szkolenie z zakresu technik mikroskopowych “Microscopy workshop – basic microscopy”, zorganizowane pod patronatem ENFSI European Paint and Glass Working Group, Wetzlar, Niemcy.

9 maja 2008 – egzamin zakończony certyfikatem “Asystent systemu zarządzania jakością”, zorganizowane przez Polskie Centrum Badań i Certyfikacji S.A, Kraków, Polska.

9-13 czerwca 2008 – szkolenie z zakresu jakości zakończone egzaminem i uzyskaniem certyfikatu “Asystent systemu zarządzania jakością w laboratorium”, zorganizowane przez Polskie Centrum Badań i Certyfikacji S.A, Kraków, Polska.

13 czerwca 2008 – egzamin zakończony certyfikatem “Pełnomocnik systemu zarządzania jakością”, zorganizowane przez Polskie Centrum Badań i Certyfikacji S.A., Kraków, Polska.

16-18 września 2008 – szkolenie z zakresu jakości zakończone egzaminem i uzyskaniem certyfikatu „Auditor wewnętrzny systemu zarządzania jakością w laboratorium”, zorganizowane przez Polskie Centrum Badań i Certyfikacji S.A, Kraków, Polska.

16-17 czerwca 2011 – 5th FORSTAT workshop „Forensic Evidence Evaluation – Problems and Applications”, Kraków, Polska.

5-8 czerwca 2012 – 6th FORSTAT workshop „Forensic Evidence Evaluation – Problems and Applications”, Edynburg, Wielka Brytania.

7 października 2015 – szkolenie „Warsztaty doskonalące dla pełnomocników i auditorów wewnętrznych systemu zarządzania w laboratoriach według normy PN – EN ISO/IEC 17025 oraz procedur PCA”, zorganizowane przez Polskie Centrum Badań i Certyfikacji S.A, Kraków, Polska.

10-11 maja 2016 – szkolenie z zakresu technik mikroskopowych „Microscopy workshop – basic microscopy”, zorganizowane pod patronatem ENFSI European Paint and Glass Working Group, Wetzlar, Niemcy.

12-13 maja 2016 – szkolenie z zakresu technik mikroskopowych „Microscopy workshop – advance microscopy”, zorganizowane pod patronatem ENFSI European Paint and Glass Working Group, Wetzlar, Niemcy.

13-15 września 2016 – 9th FORSTAT workshop „Forensic Evidence Evaluation – Problems and Applications”, Kraków, Polska.

3 marca 2017 – Warsztaty z zasad stosowania metrologii w pomiarach chemicznych, Poznań, Polska.

8 czerwca 2017 – Warsztaty „Evaluation of evidence” zorganizowane podczas „ENFSI European Fibres Group annual meeting” (Leiden, Holandia) dotyczące zastosowania ilorazu wiarygodności do oceny wartości dowodowej włókien na poziomie aktywności.

Stypendia

Stypendium dla młodych naukowców na udział w 6th FORSTAT workshop „Forensic Evidence Evaluation – Problems and Applications” (5-8 czerwca 2012, Edynburg, Wielka Brytania) ufundowane przez European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI) w ramach projektu „STEOFRAE – Strengthening the Evaluation of Forensic Results across Europe”.

ZAŁĄCZNIK D

Załącznik D – Dorobek naukowy, dydaktyczny, organizacyjny i opiniodawczy**PUBLIKACJE**

(IF=18,402, pkt. MNiSW= 262, h=4, 30 cytowań (bez autocytowań) w 26 publikacjach – stan według Web of Science, 2 listopada 2017 roku)

A. Opublikowane w czasopismach posiadających współczynnik wpływu (impact factor; IF)

- 1) Zięba-Plaus J., **Michalska A.**, Weselucha-Birczyńska A., Characterisation of paint samples by infrared and Raman spectroscopy for criminalistic purposes. *Journal of Molecular Structure* 2011 (993) 134-141. IF=1,600, MNiSW=20.
- 2) Zięba-Palus J., **Michalska A.**, Characterisation of blue pigments used in automotive paints by Raman spectroscopy. *Journal of Forensic Sciences* 2014 (59) 943-949. IF=1,160, MNiSW=30.
- 3) Zięba-Palus J., **Michalska A.**, Photobleaching as an useful technique in reducing of fluorescence in Raman spectra of blue automobile paint samples. *Vibrational Spectroscopy* 2014 (74) 6-12. IF=2,003, MNiSW=25.
- 4) **Michalska A.**, Martyna A., Zięba-Palus J., Zadora G., Application of a likelihood ratio approach in solving a comparison problem of Raman spectra recorded for blue automotive paints. *Journal of Raman Spectroscopy* 2015 (46) 772-783. IF=2,671, MNiSW=30.
- 5) Martyna A., **Michalska A.**, Zadora G., Interpretation of FTIR spectra of polymers and Raman spectra of car paints by means of likelihood ratio approach supported by wavelet transform for reducing data dimensionality. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2015 (407) 3357-3376. IF= 3,436, MNiSW=40.
- 6) **Michalska A.**, Zadora G., Martyna A., Optimized sample preparation for glass fragments by scanning electron microscopy – energy dispersive X-ray spectrometry. *Analytical Letters* 2016 (49) 1884-1895, IF= 1,030, MNiSW= 20.
- 7) Martyna A., Zadora G., Neocleous T., **Michalska A.**, Dean N., Hybrid approach combining chemometrics and likelihood ratio framework for reporting the evidential value of spectra. *Analytica Chimica Acta* 2016 (931) 34-46. IF=4,513, MNiSW = 45.
- 8) **Michalska A.**, Martyna A., Zadora G., Investigation of various factors influencing Raman spectra interpretation with the use of likelihood ratio approach. *Forensic Science International* 10.1016/j.forsciint.2017.10.034. IF=1,989, MNiSW = 40.

B. Opublikowane w czasopismach nie posiadających współczynnika wpływu (impact factor; IF)

- 1) **Michalska A.**, Zadora G., Świętek M., Glass fragments as important criminalistic evidence – case studies. *Problems of Forensic Sciences* 2015 (102) 115-137. MNiSW=12.
- 2) Zadora G., Martyna A., **Michalska A.**, Wlasiuk P., An introduction to evaluation of physicochemical data for forensic purposes with application of likelihood ratio test. *Forensic Science and Technology* 2016 (41) 209-220.

C. Rozdział w książce w druku

- 1) Zadora G., **Michalska A.**, Scanning Electron Microscopy in Forensic Analysis (in:) Analytical Techniques in Forensic Sciences (Eds.:) Wolstenholme R., Jickells S., Forbes S., Wiley.

WYSTĄPIENIA NAUKOWE (łącznie 64)**A. Prezentowane osobiście (10 wystąpień ustnych i 5 posterów)****2017****VI Konferencja Chemometria i Metrologia w Analityce, 1-3 marca 2017, Poznań:**

- 1) **Michalska A.**, Martyna A., Zadora G., *Wykorzystanie ilorazu wiarygodności w interpretacji widm Ramana w kontekście problemu porównawczego*; wystąpienie ustne.

Konferencja „Badanie dowodów rzeczowych w celu ustalenia przebiegu zdarzenia” podczas 6. Targi Techniki Kryminalistycznej CRIMELAB, Warszawa, 30 marca 2017:

- 1) **Michalska A.**, *Kryminalistyczne badania fragmentów szkła*; wystąpienie ustne.

Seminarium wewnętrzne Instytutu Ekspertyz Sądowych im. Prof. dra Jana Sehna w Krakowie, 18 kwietnia 2017:

- 1) **Michalska A.**, Zadora G., Świętek M., *Fragmenty szkła jako istotny ślad kryminalistyczny*; wystąpienie ustne.

ENFSI European Fibres Group annual meeting, 7-9 czerwca 2017, Leiden, Holandia:

- 1) **Michalska A.**, Wąs-Gubała J., *Car accident or homicide? Verification of possible event circumstances – a case study*; wystąpienie ustne.

III Konferencja „Ślady kryminalistyczne i ich znaczenie w postępowaniu przygotowawczym”, 20 października 2017, Kraków:

- 1) **Michalska A.**, *Powiązanie osoby z miejscem zdarzenia na podstawie analizy fragmentów szkła*; wystąpienie ustne.

2016

Seminarium “Obrazowanie FTIR w mikro- i nanoskali: Struktura molekularna a jej dystrybucja przestrzenna”, 16-17 czerwca 2016, Kraków:

1) Martyna A., Michalska A., Zadora G., *Wartość dowodowa widm w podczerwieni i widm Ramana*; poster.

33rd European Congress on Molecular Spectroscopy (EUCMOS 2016), 30 lipca-4 sierpnia 2016, Szeged, Węgry:

1) Michalska A., Martyna A., Zadora G., *Could Raman spectra recorded after photobleaching process be used in solving a comparison problem?*; wystąpienie ustne.

2) Michalska A., Martyna A., Zadora G., *The influence of objective magnification on Raman spectra variability recorded for blue car paints*; poster.

Forensic Statistics Research Group Meeting, 12 września 2016, Kraków:

1) Michalska A., Martyna A., Zadora G., *Recent developments in Raman spectra evaluation by likelihood ratio approach?*; wystąpienie ustne.

2015

21st Annual Meeting of ENFSI Paint and Glass Working Group, 21-23 września 2015, Jachranka k/ Warszawy:

1) Michalska A., Martyna A., Zadora G., *To evaluate or not to evaluate evidential value of Raman spectra obtained after photobleaching pre-treatment with the use of LR test?*; wystąpienie ustne.

2) Zadora G., Michalska A., Świętek M., *Evidential value of glass fragments based on combined results of SEM-EDX and toolmarks analysis – case studies*; poster.

Seminarium wewnętrzne Instytutu Ekspertyz Sądowych im. Prof. dra Jana Sehna w Krakowie, 17 listopada 2015:

1) Michalska A., Martyna A., Zadora G., *Wstępne naświetlanie próbki (ang. photobleaching) jako metoda pozwalająca uzyskać informatywne widma Ramana*; wystąpienie ustne.

Konferencja „Ślady kryminalistyczne i ich znaczenie w postępowaniu przygotowawczym”, 26 listopada 2015, Kraków:

1) Michalska A., Zadora G., *Fragmenty szkła jako istotny ślad kryminalistyczny – problem porównawczy*; wystąpienie ustne.

2014

VIII Seminarium Naukowe „Aktualne Problemy Chemii Analitycznej”, 16 maja 2014, Katowice:

1) Michalska A., Martyna A., Zięba-Palus J., Zadora G., *Wartość dowodowa widm ramanowskich uzyskanych w trakcie analizy niebieskich lakierów samochodowych*; poster.

2010

16th Annual Meeting of ENFSI Paint and Glass Working Group, , 27-29 września 2010, Kraków:

1) Zięba-Palus J., Michalska A., *Differentiation of paint chips with the use of Raman spectroscopy*; poster.

B. Współautorstwo (podkreślono osobę prezentującą; 25 wystąpienia ustne i 24 postery)

2017

Seminarium wewnętrzne Instytutu Ekspertyz Sądowych im. Prof. dra Jana Sehna w Krakowie, 3 stycznia 2017:

1) Zadora G., Martyna A., Michalska A., *Dlaczego warto stosować iloraz wiarygodności?*; wystąpienie ustne.

Symposium on Chemometrics in Forensic Sciences Torino, 26 stycznia 2017:

1) Zadora G., Martyna A., Michalska A., Własiuk P., Menżyk A., *Likelihood ratio models supported by chemometric tools – overview of recent models*, wystąpienie ustne.

VI Konferencja Chemometria i Metrologia w Analityce, 1-3 marca 2017, Poznań:

1) Zadora G., Martyna A., Michalska A., Własiuk P., Menżyk A., *Interpretacja danych fizykochemicznych z wykorzystaniem testu ilorazu wiarygodności i metod chemometrycznych*; wystąpienie ustne.

2) Martyna A., Michalska A., Zadora G., *Zastosowanie hybrydowych modeli LR wykorzystujących wieloblokową PCA do interpretacji danych wielowymiarowych*; poster.

XI Seminarium Naukowe „Aktualne Problemy Chemii Analitycznej”, 12 maja 2017, Katowice:

1) Martyna A., Michalska A., Zadora G., *Interpretacja danych wielowymiarowych z wykorzystaniem modeli hybrydowych łączących wieloblokową PCA i iloraz wiarygodności dla potrzeb wymiaru sprawiedliwości*; poster.

10th International Conference on Forensic Inference and Statistics, 5-8 września 2017, Minneapolis, USA:

1) Martyna A., Michalska A., Zadora G., *The use of multiblock PCA within the hybrid likelihood ratio models for interpretation of highly multidimensional data*; wystąpienie ustne.

Międzynarodowa Konferencja Naukowa z okazji 60-lecia powstania Laboratorium Kryminalistycznego Komendy Wojewódzkiej Policji w Krakowie, 20-22 września 2017, Kraków:

1) Wąs-Gubała J., Michalska A., Kowalski R., *Opracowanie i akredytacja metody badań identyfikacyjno-porównawczych fragmentów pojedynczych włókien w IES*; wystąpienie ustne.

Canadian Society of Forensic Sciences (CSFS) Webinar: The Weight of Physical Evidence, 2 listopada 2017:

1) Zadora G., Michalska A., *Interpretation of glass fragments for forensic purposes – case studies*; wystąpienie ustne.

MULTI-modal Imaging of FOREnsic SciEnce Evidence tools for Forensic Science, Action CA16101 Conference, Uncovering Forensic Imaging Capabilities, 6-9 listopada 2017:

1) Martyna A., Zadora G., Michalska A., Własiuk P., Menżyk A., *Interpreting highly multivariate data for forensic purposes within the likelihood ratio framework*; wystąpienie ustne.

2) Kunicki M., Michalska A., *Forensic methods for determining the sequence of intersecting lines – capabilities and limitations*; wystąpienie ustne.

2016

XI Konferencja „Analiza specjacyjna – możliwości i kierunki rozwoju”, 4-5 marca 2016, Poznań:

1) Zadora G., Martyna A., **Michalska A.**, Patryk W., *Chemia analityczna a metody interpretacji wyników badań*; wystąpienie ustne.

X Seminarium Naukowe „Aktualne Problemy Chemii Analitycznej”, 13 maja 2016, Katowice:

1) **Michalska A.**, Martyna A., Zadora G., *Ocena zmienności wewnątrz- i międzyobiektowej widm Ramana rejestrowanych dla niebieskich lakierów samochodowych*; poster.

XVI Conference - Chemometrics in Analytical Chemistry, 6-10 czerwca 2016, Barcelona, Hiszpania:

1) Zadora G., Martyna A., **Michalska A.**, P. Własiuk, *Likelihood ratio models supported by chemometric tools – recent models overview*; wystąpienie ustne.

2) Martyna A., Zadora G., Neocleous T., **Michalska A.**, Dean N., *Applying distance representation within the likelihood ratio framework for reporting the evidential value of infrared and Raman spectra*; poster.

Seminarium Katedry Kryminalistyki WPIA UJ, 22-25 września, Ustroń:

1) Zadora G., Martyna A., **Michalska A.**, Własiuk P., Świętek M., *Dlaczego warto stosować iloraz wiarygodności?*; wystąpienie ustne

Toolmarks ENFSI WG meeting, 4-6 października 2016, Wiedeń, Austria:

1) Zadora G., **Michalska A.**, Świętek M., *Toolmarks and physicochemical analysis of glass fragments – evidential value of combined evidence*; poster.

9th EDEWG Conference “Digital images-friend and foe”, 15-18 listopada 2016, Frankfurt, Niemcy:

1) Kunicki M., **Michalska A.**, *Evaluation of Raman spectroscopy to examination of ink lines intersection*; poster

XXI Konferencji „Nowoczesne metody instrumentalne w analizie śladowej”, 8-9 grudnia 2016, Warszawa:

1) **Michalska A.**, Martyna A., Zadora G., *Postęp w interpretacji widm Ramana w rozwiązywaniu problemu porównawczego na przykładzie niebieskich lakierów samochodowych*; wystąpienie ustne.

2015

IX Seminarium Naukowe „Aktualne Problemy Chemii Analitycznej”, 15 maja 2015, Katowice:

1) Martyna A., **Michalska A.**, Zadora G., *Ocena wartości dowodowej widm z wykorzystaniem modeli ilorazu wiarygodności wspartych chemometrycznymi technikami redukcji wymiarowości danych wielowymiarowych*; poster.

21st Annual Meeting of ENFSI Paint and Glass Working Group, 21-23 września 2015, Jachranka k/ Warszawy:

1) Martyna A., Michalska A., Zadora G., *Tackling the multidimensionality problem within likelihood ratio approach*; wystąpienie ustne.

IX Polska Konferencja Chemii Analitycznej, 6-10 lipca 2015, Poznań:

- 1) Martyna A., Michalska A., Zadora G., *Chemometria na sali sądowej*; wystąpienie ustne.
- 2) Zadora G., Martyna A., Michalska A., Własiuk P., *Szacowanie wartości dowodowej składu pierwiastkowego okruszków szkła – wpływ zmiany aparatury*; poster.

7th European Academy of Forensic Sciences, 6-11 września 2015, Praga, Czechy:

- 1) Michalska A., Martyna A., Zadora G., *Does application of LR approach in evaluation of evidential value of Raman spectra obtained after photobleaching pre-treatment make sense?*; wystąpienie ustne.
- 2) Martyna A., Michalska A., G. Zadora, *Interpretation of FTIR and Raman spectra by likelihood ratio approach supported by chemometric tools for reducing data dimensionality*; wystąpienie ustne.
- 3) Michalska A., Martyna A., Zadora G., *Analysis of between- and within- Raman spectra variability recorded for blue car paints*; poster.
- 4) Zadora G., Martyna A., Michalska A., Własiuk P., *Research on influence of a change of SEM-EDX instrumentation on results of likelihood ratio test*; poster.

18th EUROANALYSIS Conference, 6-10 września 2015, Bordeaux, Francja:

- 1) Zadora G., Martyna A., Michalska A., Własiuk P., *Evidential value of elemental composition of glass fragments – the effect of SEM-EDX equipment change*; poster.

„Pomiędzy Naukami”, Zjazd Fizyków i Chemików – IV Ogólnopolska Konferencja dla Studentów i Doktorantów, 18 września 2015, Chorzów, Polska:

- 1) Własiuk P., Martyna A., Michalska A., Zadora G., *Dane fizykochemiczne a wnioskowanie na potrzeby wymiaru sprawiedliwości*; wystąpienie ustne.

ATVS Seminars - "Los Cafés del ATVS", Escuela Politecnica Superior, Universidad Autonoma de Madrid, 28 września 2015, Madryt, Hiszpania:

- 1) Martyna A., Michalska A., Zadora G., *Evidential value of spectra assessed using the likelihood ratio supported by chemometric tools*; wystąpienie ustne.

Ślady kryminalistyczne i ich znaczenie w postępowaniu przygotowawczym, 26 listopada 2015, Kraków:

- 1) Zadora G., Michalska A., *Fragmenty szkła jako istotny ślad kryminalistyczny – problem identyfikacji i klasyfikacji*; wystąpienie ustne.

XX Konferencja „Zastosowanie metod AAS, ICP-OES i ICP-MS w analizie środowiskowej”, 4-6 listopada 2015, Łódź:

- 1) Michalska A., Zadora G., Świętek M., *Fragmenty szkła jako ślad kryminalistyczny – studium przypadków*; wystąpienie ustne.

2014

FORSTAT Research Group Meeting, 2-3 czerwca 2014, Edynburg, Wielka Brytania:

- 1) Zadora G., Martyna A., Michalska A., Własiuk P., *Multivariate data analysis – application of likelihood ratio approach*; wystąpienie ustne.

9th International Conference on Forensic Inference and Statistics, 19-22 sierpnia 2014, Leiden, Holandia:

- 1) Martyna A., Zadora G., **Michalska A.**, *Evaluation of evidential value of spectra - an application of likelihood ratio approach supported by wavelet transformation of spectra*; wystąpienie ustne.
- 2) Zadora G., Martyna A., **Michalska A.**, *Does a change of SEM-EDX equipment require the creation of new glass database?*; poster.

European Paint and Glass Working Group, 20th Annual Meeting, 22-24 września 2014, Coventry, Wielka Brytania:

- 1) Martyna A., Zadora G., **Michalska A.**, *An application of likelihood ratio approach supported by wavelet transformation for evaluation of evidential value of spectra*; wystąpienie ustne.
- 2) Zadora G., **Michalska A.**, Martyna A., *Does a change of SEM-EDX equipment require the creation of new glass database?*; wystąpienie ustne.
- 3) **Michalska A.**, Martyna A., Zięba-Palus J., Zadora G., *Evidential value of Raman spectra obtained for blue car paints*; poster.
- 4) **Michalska A.**, Zięba-Palus J., Martyna A., Zadora G., *Analysis of photobleaching process used in quenching fluorescence background in Raman spectra of blue automotive paints*; poster.

XIX Konferencja „Zastosowanie metod AAS, ICP-OES i ICP-MS w analizie środowiskowej”, 9-10 grudnia 2014, Warszawa:

- 1) Martyna A., **Michalska A.**, Zadora G., *Interpretacja danych fizykochemicznych z wykorzystaniem modeli łączących metody chemometryczne i testy statystyczne*; wystąpienie ustne.
- 2) Zadora G., Martyna A., **Michalska A.**, Własiuk P., *Wpływ zmiany aparatury SEM-EDX na szacowanie wartości dowodowej okruchów szkła*; poster.

2013

XIIth International Conference on Molecular Spectroscopy „From Molecules to Nano- and Biomaterials”, 8–12 września 2013, Kraków-Białka Tatrzańska:

- 1) Zięba-Palus J., **Michalska A.**, *Photobleaching as an useful tool in reducing of fluorescence in Raman spectra of blue automobile paint samples*; poster.

19th Annual Meeting of ENFSI Paint and Glass Working Group, 23-25 września 2013, Larnaca, Cypr:

- 1) Zięba-Palus J., **Michalska A.**, *Photobleaching as an useful tool in reducing of fluorescence in Raman spectra of blue automobile paint samples*; poster.

2012

31st European Congress on Molecular Spectroscopy (EUCMOS 2012), 26-31 sierpnia 2012, Cluj-Napoca, Rumunia:

- 1) Zięba-Palus J., **Michalska A.**, *Characterisation of blue car paints by the use of Raman spectroscopy for criminalistic purposes*; poster.

2011

17th Annual Meeting ENFSI Paint and Glass Working Group, 26-28 września 2011, Wilno, Litwa:

- 1) Zięba-Palus J., **Michalska A.**, *Differentiation of blue automotive paints by the use of Raman spectroscopy*; poster.
- 2) Zięba-Palus J., **Michalska A.**, **Trzcińska B.**, *Application of infrared and Raman spectroscopy in paint traces comparative examination. A case study*; poster.

The 19th World Meeting of the International Association of Forensic Sciences, 14-17 września 2011, Funchal, Madera, Portugalia:

- 1) Was-Gubała J., Zięba-Palus J., **Michalska A.**, *Application of infrared and Raman spectroscopy to identification of chemical composition of selected forensic traces*; poster.

2010

VII Polska Konferencja Chemii Analitycznej, 5-8 lipca 2010, Kraków:

- 1) Zięba-Palus J., **Michalska A.**, *Identyfikacja składu barwnikowego lakierów samochodowych metodą mikrospektrometrii w podczerwieni i mikrospektrometrii Ramana*; poster.

30th European Congress of Molecular Spectroscopy, 29 sierpnia - 3 września 2010, Florencja, Włochy:

- 1) Zięba-Palus J., **Michalska A.**, **Weselucha-Birczynska A.**, *Characterisation of paint samples by infrared and Raman spectroscopy for criminalistic purposes*; poster.

2009

Xth International Conference on Molecular Spectroscopy, 6-10 września 2009, Białka Tatrzańska:

- 1) Zięba-Palus J., **Michalska A.**, *Application of infrared and Raman Spectroscopy in examination of car paint chips for forensic purposes*; poster.

UDZIAŁ W GRANTACH I TEMATACH NAUKOWYCH

1. *Performance of an international study (proficiency test) on the comparability of forensic findings and statements in gunshot residue investigation.* Finansowany przez program AGIS, European Commission framework (JLS/2006/AGIS/041; 2006–2008) – wykonawca.
2. *Zastosowanie mikrospektrometrii ramanowskiej w rutynowych badaniach identyfikacyjnych i porównawczych wybranych śladów kryminalistycznych.* Finansowany przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (O N204 115036; 2009-2012) – wykonawca.
3. *Badania składu pigmentowego i barwnikowego wybranych śladów kryminalistycznych metodami spektrometrycznymi.* Temat badawczy Instytutu Ekspertyz Sądowych im. Prof. dra Jana Sehna (III/K; 2009-2012) – wykonawca.
4. *Wartość dowodowa danych fizykochemicznych uzyskanych w trakcie analizy mikrośladów różnymi metodami instrumentalnymi.* Temat badawczy Instytutu Ekspertyz Sądowych im. Prof. dra Jana Sehna (III/K; 2011-2012) – wykonawca.

5. *Redukcja wymiarowości przestrzeni zmiennych danych fizykochemicznych w obliczeniach ilorazu wiarygodności.* Temat badawczy Instytutu Ekspertyz Sądowych im. Prof. dra Jana Sehna (VI/K; 2013-2014) – wykonawca.

6. *Ujawnianie słabo widocznych plam krwawych na odzieży i określanie mechanizmu ich powstawania dla potrzeb rekonstrukcji zdarzenia.* Temat badawczy Instytutu Ekspertyz Sądowych im. Prof. dra Jana Sehna (V/K; 2012-2015) – wykonawca.

7. *Wypracowanie założeń odnośnie konstruowania baz danych fizykochemicznych umożliwiających oszacowanie nieobciążonych estymatorów parametrów stosowanych w modelach ilorazu wiarygodności.* Temat badawczy Instytutu Ekspertyz Sądowych im. Prof. dra Jana Sehna (IV/K; 2015-2017) – wykonawca.

8. *Ocena przydatności spektroskopii ramanowskiej w ustalaniu kolejności naniesienia krzyżujących się linii graficznych.* Temat badawczy Instytutu Ekspertyz Sądowych im. Prof. dra Jana Sehna (II/K; 2016-2017) – wykonawca.

DZIAŁALNOŚĆ DYDAKTYCZNA

Prowadzenie w Instytucie Ekspertyz Sądowych w Krakowie ćwiczeń „Zastosowanie spektroskopii ramanowskiej w analizie mikrośladów” realizowanych dla studentów II roku chemii Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach, w ramach laboratorium specjalizacyjnego B (specjalizacja chemia sądowa) – od roku akademickiego 2015/2016.

Prowadzenie warsztatów dotyczących możliwości wykorzystania obrazowania ramanowskiego w ustaleniu kolejności nanoszenia krzyżujących się linii podczas “*The End User perspective: state of the art of operational imaging technologies , issues limitations and desirables (digital strand)*”, Action CA16101 - MULTI-modal Imaging of FOREnsic SciEnce Evidence - tools for Forensic Science; 6th November 2017.

DZIAŁALNOŚĆ ORGANIZACYJNA

A. Uczestnictwo w komitetach organizacyjnych:

- 1) 5th FORSTAT Workshop „Forensic Evidence Evaluation – Problems and Applications”, 16-17 czerwca 2011, Kraków.
- 2) 9th Annual Meeting of Forensic International Network for Explosives Investigation (FINEX), 9-10 maja 201, Kraków.
- 3) FORSTAT Workshop – „Forensic Evidence Evaluation – Problems and Applications”, 13-15 września 2016, Kraków.

B. Uczestnictwo we współtworzeniu procedur ogólnych w Instytucie Ekspertyz Sądowych im. Prof. dra Jana Sehna w Krakowie celem wprowadzenia systemu zarządzania jakością wg normy PN/EN ISO IEC 17025:2005, w tym opracowanie procedury badawczej i dokumentów związanych dotyczących akredytacji badań porównawczych włókien.

C. Uczestnictwo w pracach grup roboczych zrzeszonych w Europejskiej Sieci Instytutów Nauk Sądowych (European Network of Forensic Science Institutes):

- a) ENFSI Paint and Glass WG,
- b) ENFSI Textile and Hair WG,
- c) ENFSI Quality and Competence Liaison Group.

DZIAŁALNOŚĆ OPINIODAWCZA

1 lipca 2017 uzyskanie tytułu biegłego Instytutu Ekspertyz Sądowych im. Prof. dra Jana Sehna w Krakowie z zakresu fizykochemicznych badań kryminalistycznych (ze szczególnym uwzględnieniem badań dotyczących włókien, śladów powystrzałowych, czy drobin szkła).